

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Product Code: RE7160-K

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park West
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
☎ +44 191 215 4242



EN FR IT DE ES PT SV EL DA

Instructions for Use

Please read before using this product.

Mode d'emploi

À lire avant d'utiliser ce produit.

Istruzioni per L'uso

Si prega di leggere, prima di usare il prodotto.

Gebrauchsanweisung

Bitte vor der Verwendung dieses Produkts lesen.

Instrucciones de Uso

Por favor, leer antes de utilizar este producto.

Instruções de Utilização

Leia estas instruções antes de utilizar este produto.

Instruktioner vid Användning

Var god läs innan ni använder produkten.

Οδηγίες χρήσης

Παρακαλούμε διαβάστε τις οδηγίες πριν χρησιμοποιήσετε το προϊόν αυτό.

Brugsanvisning

Læs venligst før produktet tages i brug.

Check the integrity of the packaging before use.

Vérifier que le conditionnement est en bon état avant l'emploi.

Prima dell'uso, controllare l'integrità della confezione.

Vor dem Gebrauch die Verpackung auf Unversehrtheit überprüfen.

Comprobar la integridad del envase, antes de usarlo.

Verifique a integridade da embalagem antes de utilizar o produto.

Kontrollera att paketet är obrutet innan användning.

Ελέγξτε την ακεραιότητα της συσκευασίας πριν από τη χρήση.

Kontroller, at pakken er ubeskadiget før brug.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Product No: RE7160-K

Intended Use

For in vitro diagnostic use.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) is intended for the enzymatic pretreatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections prior to incubation with a primary antibody in an immunohistochemical (IHC) procedure. This product can be used for epitope retrieval with Novocastra™ antibodies for which trypsin is recommended, known exceptions to this are: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p, and NCL-CYCLIN D1-GM. The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Principle of Procedure

Enzyme pretreatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections improves the staining of some antibodies by exposing epitopes within tissue that have been masked during fixation. The first proteolytic enzyme employed for epitope retrieval was trypsin.¹ Other proteolytic enzymes that can be used for this purpose include Protease XXIV and Pepsin.² More recently, proteinase K which is commonly used in in situ hybridization techniques has also been employed.

This product is used in an IHC procedure, which allows the qualitative identification by light microscopy of antigens in sections of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, via sequential steps with interposed washing steps (for IHC staining Principle of Procedure see appropriate detection system Instructions for Use). Epitope retrieval by enzymatic pretreatment is recommended for a limited number of antibodies (see primary antibody **Recommendations on Use**). Optimum conditions for epitope retrieval should be validated by the user as these are dependant upon tissue, fixation and/or primary antibody.

Reagents Provided

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0.75 mL). Enzyme in 40% v/v glycerol containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, with 1 mM calcium acetate.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 mL). Tris-buffered saline, surfactant and 0.35% ProClin™ 950.
3. Empty dropper bottle.

Reconstitution, Mixing, Dilution, Titration

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K requires dilution in the Proteinase K Buffer RE7127 to prepare a working solution (see Proteinase K Working Solution). The user must validate any such change. Further dilution may result in loss of antigen staining. The user must validate any such change.

Storage and Stability

Store at 2–8 °C. Do not freeze. Return to 2–8 °C immediately after use. Do not use after expiration date indicated on the product label. Storage conditions other than those specified must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product, therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient samples.

Specimen Preparation

The recommended fixative is 10% neutral-buffered formalin for paraffin-embedded tissue sections.

Warnings and Precautions

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contains Proteinase K (<10%).

GHS08: Health hazard.

Signal words: Danger.

H334: May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.

P261: Avoid breathing dust/fumes/gas/mist/vapours/spray.

P285: In case of inadequate ventilation wear respiratory protection.

P304+341: IF INHALED: If breathing is difficult, remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing.

P342+311: If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTRE or doctor.

P501: Dispose of contents/container to hazardous or special waste collection point.

A Material Safety Data Sheet is available upon request or available from www.LeicaBiosystems.com

For Professional Users.

Specimens, before and after fixation, and all materials exposed to them, should be handled as if capable of transmitting infection and disposed of with proper precautions.³

Never pipette reagents by mouth and avoid contacting the skin and mucous membranes with reagents and specimens. If reagents or specimens come in contact with sensitive areas, wash with copious amounts of water.

Consult Federal, State or local regulations for disposal of any potentially toxic components.

Minimize microbial contamination of reagents or an increase in non-specific staining may occur. Incubation times or temperatures other than those specified may give erroneous results. Any such change must be validated by the user.

Procedure

A. Reagents required but not supplied

See primary antibody Instructions for Use

B. Equipment required but not supplied

General immunohistochemistry laboratory equipment.

C. Methodology

Prior to undertaking this methodology, users must be trained in immunohistochemical techniques and the use in combination of Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primary antibody, its dilution, together with the detection system should be validated by the user on a series of known positive and negative controls.

Unless indicated, all steps are performed at room temperature (25 °C). The following steps should be undertaken prior to incubation with the primary antibody.

1. Wash slides in de-ionized water.
2. Incubate with Proteinase K Working Solution (see Proteinase K Working Solution) for 5 minutes.
3. Wash in TBS.
4. Proceed with IHC protocol according to manufacturers' Instructions for Use for the primary antibody and detection system.

Proteinase K Working Solution

Add 40 µL of Proteinase K Concentrate RE7126 to 6 mL of Proteinase K Buffer RE7127. Load solution into the dropper bottle provided.

The working solution is stable for up to 3 months when stored at 2–8 °C.

Quality Control

Differences in tissue processing and technical procedures in the user's laboratory may produce significant variability in results, necessitating regular performance of in-house controls in addition to the following procedures. Controls should be fresh autopsies/biopsy/surgical specimens, formalin-fixed, processed and paraffin wax-embedded as soon as possible in the same manner as the patient sample(s).

Positive Tissue Control

Used to indicate correctly prepared tissues and proper staining techniques. One positive tissue control should be included for each set of test conditions/primary antibody in each staining run. A tissue with weak positive staining is more suitable than a tissue with strong positive staining for optimal quality control and to detect minor levels of reagent degradation.⁴ For recommended positive control tissue see primary antibody Instructions for Use. If the positive tissue control fails to demonstrate positive staining, results with the test specimens should be considered invalid.

Negative Tissue Control

Should be examined after the positive tissue control to verify the specificity of the labeling of the target antigen by the primary antibody. For recommended negative control tissue see primary antibody Instructions for Use. Alternatively, the variety of different cell types present in most tissue sections frequently offers negative control sites, but this should be verified by the user. Non-specific staining, if present, usually has a diffuse appearance. Sporadic staining of connective tissue may also be observed in sections from excessively formalin-fixed tissues. Use intact cells for interpretation of staining results. Necrotic or degenerated cells often stain non-specifically.⁵ False-positive results may be seen due to non-immunological binding of proteins or substrate reaction products. They may also be caused by endogenous enzymes such as pseudoperoxidase (erythrocytes), endogenous peroxidase (cytochrome C), or endogenous biotin⁶ (eg. liver, breast, brain, kidney). To differentiate endogenous enzyme activity or non-specific binding of enzymes from specific immunoreactivity, additional patient tissues may be stained exclusively with substrate-chromogen, Streptavidin-HRP or labeled polymer and substrate-chromogen, respectively. If specific staining occurs in the negative tissue control, results with the patient specimens should be considered invalid.

Negative Reagent Control

Use a non-specific negative reagent control in place of the primary antibody with a section of each patient specimen to evaluate non-specific staining and allow better interpretation of specific staining at the antigen site.

Patient Tissue

Examine stained patient specimens last. Positive staining intensity should be assessed within the context of any non-specific background staining of the negative reagent control. As with any immunohistochemical test, a negative result means that the antigen was not detected, not that the antigen was absent in the cells/tissue assayed. If necessary, use a panel of antibodies to identify false-negative reactions.

Limitations

Immunohistochemistry is a multistep diagnostic process that consists of specialized training in the selection of the appropriate reagents; tissue selection, fixation, and processing; preparation of the IHC slide; and interpretation of the staining results.

Tissue staining is dependent on the handling and processing of the tissue prior to staining. Improper fixation, freezing, thawing, washing, drying, heating, sectioning or contamination with other tissues or fluids may produce artifacts, antibody trapping, or false negative results. Inconsistent results may be due to variations in fixation and embedding methods, or to inherent irregularities within the tissue.⁷

Excessive or incomplete counterstaining may compromise proper interpretation of results.

The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K is for use on paraffin-embedded sections with specific fixation requirements. Not all antigens require epitope retrieval. Optimum conditions for epitope retrieval should be validated by the user as these are dependant upon tissue, fixation and/or primary antibody. Unexpected antigen expression may occur, especially in neoplasms. The clinical interpretation of any stained tissue section must include morphological analysis and the evaluation of appropriate controls.

Performance Characteristics

The performance of Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K has been validated using Novocastra™ primary antibodies for which trypsin is the recommended retrieval technique. This product is stable up to the expiry date indicated on the product label.

Bibliography

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Amendments to Previous Issue

Warnings and Precautions.

Date of Issue

17 February 2015

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Référence du produit : RE7160-K

Utilisation prévue

Diagnostic in vitro.

Le Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K est destiné au prétraitement enzymatique des coupes tissulaires, fixées au formol, incluses en paraffine, avant incubation avec un anticorps primaire dans le cadre d'une procédure immunohistochimique (IHC). Ce produit peut être utilisé pour la restauration des épitopes avec les anticorps Novocastra™ pour lesquels la trypsine est recommandée, à l'exception de, NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-III, et NCL-CYCLIN D1-GM. L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

Principe de la procédure

Le prétraitement enzymatique des coupes tissulaires fixées au formol, incluses en paraffine, améliore le marquage de certains anticorps en exposant les épitopes présents dans les tissus qui ont été masqués au cours de la fixation. La première enzyme protéolytique employée pour la restauration des épitopes a été la trypsine.¹ D'autres enzymes protéolytiques, la protéase XXIV et la pepsine peuvent être utilisées dans ce but.² Plus récemment, la protéinase K, qui est couramment utilisé dans le cadre des techniques d'hybridation in situ, a également été employée.

Ce produit est utilisé dans le cadre d'une procédure IHC qui permet une identification qualitative des antigènes par microscopie optique, dans des coupes fixées au formol, incluses en paraffine, par l'intermédiaire d'étapes séquentielles comportant des étapes de lavage (pour le Principe de la procédure de marquage IHC, voir le Mode d'emploi du système de détection approprié). La restauration des épitopes par prétraitement enzymatique est recommandée pour un nombre limité d'anticorps (voir Recommandations d'utilisation de l'anticorps primaire). Les conditions optimales de restauration de l'épitope doivent être validées par l'utilisateur car elles sont dépendantes des tissus, de la fixation et/ou de l'anticorps primaire.

Réactifs fournis

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzyme dans du glycérol 40% v/v contenant du Tris-HCl, 10 mM, à 7,5 de pH, avec de l'acétate de calcium 1 mM.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Solution saline tamponnée de Tris, surfactant et ProClin™ 950 à 0,35 %
3. Flacon compte-gouttes vide.

Reconstitution, Mélange, Dilution, Titrage

Le Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K nécessite une dilution dans le Proteinase K Buffer RE7127 pour préparer une solution de travail (voir Solution de travail de Protéinase K). Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur. Une dilution supplémentaire est susceptible de se traduire par une perte de marquage des antigènes. Toute modification de ce type doit être validée par l'utilisateur.

Conservation et Stabilité

Conserver à 2–8 °C. Ne pas congeler. Remettre immédiatement à 2–8 °C après utilisation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit. Les conditions de conservation autres que celles qui sont spécifiées doivent faire l'objet d'une vérification par l'utilisateur. Il n'existe aucun signe visible susceptible de signaler une instabilité de ce produit, par conséquent, des contrôles positif et négatif doivent être traités en même temps que les échantillons du patient.

Préparation des spécimens

Le fixateur recommandé est le formol à 10%, tamponné, neutre, pour coupes tissulaires incluses en paraffine.

Mises en garde et Précautions

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contient et Proteinase K
(<10%).

GHS08: Danger pour la santé.

Mentions d'avertissement:
Danger.

H334: Peut provoquer des
symptômes allergiques ou d'asthme
ou des difficultés respiratoires par
inhalation.

P261: Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/
brouillards/vapeurs/aérosols.

P285: Lorsque la ventilation du local est insuffisante, porter
un équipement de protection respiratoire.

P304+341: EN CAS D'INHALATION: s'il y a difficulté à
respirer, transporter la victime à l'extérieur et la maintenir
au repos dans une position où elle peut confortablement
respirer.

P342+311: En cas de symptômes respiratoires: appeler un
CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.

P501: Éliminer le contenu/récipient dans un centre de
collecte des déchets dangereux ou spéciaux.

Une Fiche de données de sécurité est disponible sur demande ou sur le site www.LeicaBiosystems.com

Pour Utilisateurs Professionnels.

Les spécimens, avant et après fixation, ainsi que tous les matériels ayant été en contact avec eux, doivent être manipulés comme s'ils étaient susceptibles de transmettre une infection et éliminés conformément aux précautions appropriées en vigueur.³

Ne jamais pipeter les réactifs avec la bouche et éviter de mettre en contact la peau et les muqueuses avec les réactifs et les spécimens. Rincer avec de grandes quantités d'eau en cas de contact des réactifs ou des spécimens avec des zones sensibles.

Consulter les réglementations nationales, régionales ou locales en vigueur relatives à l'élimination de tous les éléments potentiellement toxiques.

Minimiser la contamination microbienne des réactifs sinon un accroissement du marquage non spécifique est susceptible de se produire. Des durées et des températures d'incubation différentes de celles qui ont été spécifiées sont susceptibles de conduire à des résultats erronés. Toutes les modifications de ce type doivent être validées par l'utilisateur.

Procédure

A. Réactifs nécessaires mais non fournis

Voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire

B. Equipements nécessaires mais non fournis

Equipements généraux d'un laboratoire d'immunohistochimie.

C. Méthodologie

Avant d'utiliser cette méthodologie, les utilisateurs doivent avoir été formés aux techniques immunohistochimiques et l'emploi en association de l'Enzyme Protéinase K (IHC) RE7160-K, de l'anticorps primaire, sa dilution, et le système de détection doit être validé par l'utilisateur sur une série de contrôles négatifs et positifs connus

Sauf mention contraire, toutes les étapes sont réalisées à température ambiante (25 °C). Les étapes suivantes doivent être mises en œuvre avant l'incubation avec l'anticorps primaire.

1. Laver les lames à l'eau désionisée.
2. Incuber avec la solution de travail Protéinase K (voir Solution de travail de Protéinase K) pendant 5 minutes.
3. Laver dans du TBS.
4. Mettre en œuvre le protocole IHC conformément aux Mode d'emploi fourni par le fabricant pour l'anticorps primaire et le système de détection.

Solution de travail Protéinase K

Ajouter 40 µL de Protéinase K Concentrate RE7126 à 6 ml de Protéinase K Buffer RE7127. Charger la solution dans le flacon compte-gouttes fourni.

La solution de travail est stable pendant 3 mois si elle est conservée à 2–8 °C.

Contrôle de qualité

Des différences de traitement des tissus et de procédures techniques du laboratoire de l'utilisateur sont susceptibles de conduire à une variabilité significative des résultats, ce qui rend nécessaire la mise en œuvre de contrôles en interne en plus des procédures suivantes. Les contrôles doivent être des spécimens frais provenant d'autopsies, de biopsies ou d'interventions chirurgicales, fixés au formol, traités et inclus en cire de paraffine dès que possible, de la même façon que le(s) échantillon(s) de patient.

Tissu de contrôle positif

Il est utilisé pour indiquer que les tissus ont été préparés correctement et que les techniques de marquage étaient appropriées. Un contrôle tissulaire positif doit être inclus dans toute opération de marquage pour chaque ensemble d'anticorps primaire/de conditions d'analyse. Un tissu présentant un marquage faiblement positif est plus adapté à un contrôle de qualité optimal qu'un tissu présentant un marquage fortement positif et il permet de détecter de moindres niveaux de dégradation du réactif.⁴ Pour le tissu de contrôle positif recommandé, voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire. Si le tissu de contrôle positif ne présente pas de marquage positif, les résultats des spécimens analysés doivent être considérés comme invalides.

Tissu de contrôle négatif

Il doit être examiné après le tissu de contrôle positif afin de vérifier la spécificité du marquage de l'antigène cible par l'anticorps primaire. Pour le tissu de contrôle négatif recommandé, voir le Mode d'emploi de l'anticorps primaire. Sinon, la diversité des types cellulaires présents dans la plupart des tissus permet de disposer fréquemment de sites de contrôle négatif, mais ils doivent être vérifiés par l'utilisateur. S'il est présent, le marquage non spécifique prend habituellement une apparence diffuse. Un marquage sporadique du tissu conjonctif peut également être observé sur des coupes de tissus qui ont été fixées par un excès de formol. Utiliser des cellules intactes pour l'interprétation des résultats du marquage. Les cellules nécrotiques ou dégénérées sont souvent marquées de façon non spécifique.⁵ Des résultats faussement positifs peuvent être observés en raison d'une liaison non immunologique à des protéines ou à des produits de réaction du substrat. Ils peuvent également être provoqués par des enzymes endogènes comme la pseudoperoxydase (érythrocytes), la peroxydase endogène (cytochrome C), ou la biotine endogène⁶ (foie, sein, cerveau, rein, par exemple). Pour différencier l'activité des enzymes endogènes ou la liaison non spécifique d'enzymes de l'immunoréactivité spécifique, des tissus supplémentaires du patient peuvent être marqués exclusivement avec le substrat chromogène, le Streptavidin-HRP, ou le polymère marqué et le substrat chromogène, respectivement. Si un marquage spécifique se produit dans le tissu de contrôle négatif, les résultats des spécimens du patient doivent être considérés comme invalides.

Réactif de contrôle négatif

Utiliser un réactif de contrôle négatif non spécifique à la place de l'anticorps primaire avec une coupe de chaque spécimen du patient afin d'évaluer le marquage non spécifique et de permettre une meilleure interprétation du marquage spécifique au niveau du site antigénique.

Tissu du patient

Examiner en dernier lieu les spécimens du patient. L'intensité du marquage positif doit être évaluée à la lumière du bruit de fond du marquage non spécifique du réactif de contrôle négatif. Comme pour toutes les analyses immunohistochimiques, un résultat négatif signifie que l'antigène n'a pas été détecté mais ne signifie pas qu'il est absent des cellules/tissus testés. Si nécessaire, employer un panel d'anticorps pour identifier les réactions faussement négatives.

Limites

L'immunohistochimie est un processus diagnostique constitué de plusieurs étapes qui nécessite une formation spécialisée relative au choix des réactifs appropriés ; au choix, à la fixation et au traitement des tissus ; à la préparation des lames IHC ; et à l'interprétation des résultats du marquage.

Le marquage des tissus dépend de leur manipulation et de leur traitement avant le marquage. Une fixation, une congélation, une décongélation, un lavage, un séchage, un chauffage, une coupe, incorrects ou une contamination par d'autres tissus ou d'autres liquides sont susceptibles de conduire à la production d'artefacts, au piégeage de l'anticorps ou à des résultats faussement négatifs. Des variations dans les méthodes de fixation et d'inclusion, ainsi que des irrégularités propres au tissu, peuvent conduire à des résultats incohérents.⁷

Une coloration de contraste excessive ou incomplète peut gêner l'interprétation correcte des résultats.

L'interprétation clinique de tout marquage, ou absence de marquage, doit être complétée par des études morphologiques utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée par un pathologiste qualifié à la lumière des antécédents cliniques du patient et d'autres analyses diagnostiques.

Le Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K doit être utilisé sur des coupes incluses en paraffine avec des exigences spécifiques en matière de fixation. Tous les antigènes ne nécessitent pas une restauration des épitopes. Les conditions optimales de restauration de l'épitope doivent être validées par l'utilisateur car elles sont dépendantes du tissu, de la fixation et/ou de l'anticorps primaire. Une expression antigénique inattendue est susceptible de se produire, en particulier au niveau des néoplasmes. L'interprétation clinique de toute coupe tissulaire marquée doit comporter une analyse morphologique et l'évaluation des contrôles appropriés.

Caractéristiques de performance

Les performances du Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K ont été validées à l'aide d'anticorps primaires Novocastra™ pour lesquels la trypsine constitue la technique de restauration recommandée. Ce produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du produit.

Bibliographie

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Amendements apportés à la version précédente

Mises en garde et Précautions.

Date de publication

17 février 2015

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Cod. prodotto: RE7160-K

Uso previsto

Per uso diagnostico in vitro.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K è destinato all'uso nel pretrattamento enzimatico di sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, prima dell'incubazione con un anticorpo primario, nel corso di una tecnica immunohistochimica (IHC). Questo prodotto può essere impiegato per lo smascheramento degli epitopi con anticorpi Novocastra™, per il quale si raccomanda l'uso di tripsina. Eccezioni note sono rappresentate da , NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip, e NCL-CYCLIN D1-GM.

L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

Principio della procedura

Il pretrattamento enzimatico di sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, migliora la colorazione di alcuni anticorpi, esponendo gli epitopi presenti nel tessuto e mascherati durante la fissazione. Il primo enzima proteolitico impiegato per lo smascheramento degli epitopi è stato la tripsina.¹ Altri enzimi proteolitici che possono essere impiegati a tale scopo sono, ad esempio, la proteasi XXIV e la pepsina.² Più recentemente, è stata utilizzata anche la proteinasi K, comunemente impiegata nelle tecniche di ibridazione in situ.

Questo prodotto viene impiegato nel corso di una tecnica IHC, che consente l'identificazione qualitativa in microscopia ottica degli antigeni in sezioni tissutali fissate in formalina e incluse in paraffina, attraverso fasi sequenziali intervallate da fasi di lavaggio (per il Principio della procedura relativo alla colorazione IHC, vedere le Istruzioni per l'uso del sistema di determinazione corrispondente). Lo smascheramento degli epitopi dopo pretrattamento enzimatico è consigliato per un numero limitato di anticorpi (vedere le Raccomandazioni per l'uso per l'anticorpo primario). Le condizioni ottimali per lo smascheramento degli epitopi vanno convalidate dall'utente, poiché dipendono dal tessuto, dalla fissazione e/o dall'anticorpo primario.

Reagenti forniti

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzima in glicerolo 40% v/v contenente 10 mM di Tris-HCl, a pH 7,5, con 1 mM di calcio acetato.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Tampone Tris, surfattante e 0,35% di ProClin™ 950.
3. Flaconcino contagocce vuoto.

Ricostituzione, miscelazione, diluizione, titolazione

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K richiede la diluizione in Proteinase K Buffer RE7127 per la preparazione di una soluzione di lavoro (vedere Soluzione di lavoro Proteinase K). Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente. L'ulteriore diluizione potrebbe causare una perdita di colorazione dell'antigene. Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

Conservazione e stabilità

Conservare a 2–8 °C. Non congelare. Immediatamente dopo l'uso, riportare a 2–8 °C. Non usare dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta del prodotto. Condizioni di conservazione diverse da quelle sopra specificate vanno verificate dall'utente. Non essendoci segni evidenti che indichino l'instabilità del prodotto, i controlli positivi e negativi vanno eseguiti in parallelo ai test sui campioni del paziente.

Preparazione del campione biologico

Il fissativo raccomandato è la formalina tamponata neutra al 10% per sezioni tissutali incluse in paraffina.

Avvertenze e precauzioni

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contiene Enzyme Proteinase K
(<10%).

GHS08: Pericolo per la salute.

Avvertenze: Pericolo.

H334: Può provocare sintomi
allergici o asmatici o difficoltà
respiratorie se inalato.

P261: Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i
vapori/gli aerosol.

P285: In caso di ventilazione insufficiente utilizzare un
apparecchio respiratorio.

P304+341: IN CASO DI INALAZIONE: se la respirazione è
difficile, trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo
a riposo in posizione che favorisca la respirazione.

P342+311: In caso di sintomi respiratori: contattare un
CENTRO ANTIVELENI o un medico.

P501: Smaltire il prodotto/recipiente in un punto di raccolta
rifiuti pericolosi o speciali.

Una scheda di sicurezza del prodotto (MSDS) è disponibile su richiesta o dal sito www.LeicaBiosystems.com

Per Uso Professionale.

Prima e dopo la fissazione, i campioni biologici e tutti i materiali ad essi esposti vanno trattati come potenzialmente infettanti e smaltiti con le appropriate precauzioni.³

Non pipettare i reagenti con la bocca ed evitare il contatto dei reagenti e dei campioni biologici con la pelle e con le mucose. Se i reagenti o i campioni biologici vengono a contatto con zone sensibili, sciacquare abbondantemente le parti interessate.

Fare riferimento alla normativa federale, statale o locale per lo smaltimento dei componenti potenzialmente tossici.

Ridurre al minimo la contaminazione microbica dei reagenti, allo scopo di evitare un aumento di colorazione aspecifica. Tempi o temperature d'incubazione diversi da quelli specificati possono condurre a risultati non veritieri. Tali eventuali variazioni devono essere convalidate dall'utente.

Procedura

A. Reagenti necessari ma non forniti

Vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario

B. Attrezzature necessarie ma non fornite

1. Attrezzatura di base del laboratorio di immunostochimica.

C. Metodologia

Prima di intraprendere questa metodologia, l'utente deve aver acquisito esperienza con le tecniche immunostochimiche e l'uso in combinazione di Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, dell'anticorpo primario, la sua diluizione, assieme al sistema di determinazione vanno convalidati dall'utente su una serie di controlli positivi e negativi noti.

Se non indicato diversamente, tutte le fasi vanno condotte a temperatura ambiente (25 °C). Effettuare le seguenti operazioni prima dell'incubazione con l'anticorpo primario.

1. Lavare i vetrini con acqua deionizzata.
2. Incubare con soluzione di lavoro Proteinase K (vedere Soluzione di lavoro Proteinase K) per 5 minuti.
3. Lavare in TBS.
4. Procedere con il protocollo IHC, seguendo le istruzioni per l'uso del fabbricante per l'anticorpo primario e per il sistema di determinazione.

Soluzione di lavoro Proteinase K

Aggiungere 40 µL di Proteinase K Concentrate RE7126 a 6 ml di Proteinase K Buffer RE7127. Caricare la soluzione nel flaconcino contagocce fornito.

La soluzione di lavoro rimane stabile fino a 3 mesi, se conservata a 2–8 °C.

Controllo qualità

Differenze nella processazione del tessuto e nelle tecniche in uso presso il laboratorio dell'utente possono produrre una discrepanza significativa nei risultati, rendendo necessaria la regolare esecuzione di controlli interni, in aggiunta alle procedure descritte di seguito. I controlli devono essere costituiti da campioni biologici freschi autoptici/bioptici/chirurgici e devono essere il più rapidamente possibile fissati in formalina, processati ed inclusi in paraffina, allo stesso modo dei campioni biologici ottenuti dal paziente.

Controllo positivo del tessuto

È usato per indicare tessuti correttamente preparati e tecniche di colorazione appropriate. Per ogni gruppo di condizioni dei test/ anticorpo primario e per ogni ciclo di colorazione, deve essere incluso un controllo positivo del tessuto. Un tessuto a debole colorazione positiva è più adatto di uno a colorazione positiva intensa per un ottimale controllo qualità e per mettere in evidenza livelli inferiori di degradazione del reagente.* Per il tessuto raccomandato come controllo positivo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario. Se il controllo positivo del tessuto non dimostra colorazione positiva, i risultati con i campioni biologici del test vanno considerati non validi.

Controllo negativo del tessuto

Va esaminato dopo il controllo positivo, per verificare la specificità della marcatura dell'antigene bersaglio da parte dell'anticorpo primario. Per il tessuto raccomandato come controllo negativo, vedere le Istruzioni per l'uso per l'anticorpo primario. In alternativa, la varietà dei tipi cellulari presenti nella maggior parte delle sezioni tissutali offre spesso siti di controllo negativo, ma questo va verificato dall'utente. La colorazione aspecifica, se presente, assume di solito aspetto diffuso. La colorazione sporadica del tessuto connettivo può anche manifestarsi in seguito ad iperfissazione di sezioni di tessuto in formalina. Per l'interpretazione dei risultati della colorazione, usare cellule intatte. Le cellule necrotiche o degenerate si colorano spesso in maniera aspecifica.⁵ Si possono osservare risultati falsamente positivi, dovuti a legame non immunologico delle proteine o a prodotti di reazione del substrato. Tali falsi positivi possono essere anche causati da enzimi endogeni quali la pseudoperoxidasi (eritrociti), la perossidasi endogena (citocromo C) o la biotina endogena⁶ (es. fegato, mammella, cervello, rene). Per differenziare l'attività enzimatica endogena o il legame enzimatico aspecifico dall'immunoattività specifica, possono essere colorati ulteriori tessuti del paziente esclusivamente e rispettivamente con substrato cromogeno, con Streptavidin-HRP o con polimero marcato e substrato cromogeno. Se nel controllo negativo del tessuto compare una colorazione specifica, i risultati sui campioni biologici ottenuti dal paziente devono essere considerati non validi.

Controllo negativo del reagente

Usare un controllo negativo aspecifico del reagente in luogo dell'anticorpo primario, con una sezione di ogni campione biologico del paziente, per valutare la colorazione aspecifica e per consentire una migliore interpretazione della colorazione specifica in corrispondenza del sito antigenico.

Tessuto del paziente

Per ultimi, esaminare i campioni biologici colorati del paziente. L'intensità della colorazione positiva va analizzata nel contesto di qualsiasi colorazione aspecifica di fondo del controllo negativo del reagente. Come per tutti gli altri test immunostochimici, un risultato negativo significa che l'antigene non è stato determinato, ma non necessariamente che fosse assente dalle cellule o dal tessuto esaminato. Se necessario, usare un pannello di anticorpi per identificare reazioni falsamente negative.

Limitazioni

L'immunistoichimica è un procedimento diagnostico a più passi (multistep) che richiede un'esperienza specifica nella selezione dei reagenti appropriati, nella selezione, fissazione e processazione dei tessuti, nella preparazione di vetrini IHC e nell'interpretazione dei risultati della colorazione.

La colorazione del tessuto dipende dalle modalità di manipolazione e di processazione del tessuto stesso, adottate prima della colorazione. La fissazione, il congelamento, lo scongelamento, il lavaggio, l'asciugatura, il riscaldamento o la sezione condotti in modo non corretto, o la contaminazione con altri tessuti o liquidi, può produrre artefatti, intrappolamento (trapping) anticorpale o risultati falsamente negativi. Risultati incompatibili possono essere dovuti a modifiche dei metodi di fissazione e di inclusione o ad irregolarità intrinseche al tessuto.⁷

Una controcolorazione eccessiva o incompleta può compromettere la corretta interpretazione dei risultati.

L'interpretazione clinica di ogni colorazione o della sua assenza va integrata da studi morfologici che utilizzino i controlli appropriati e deve essere valutata da un patologo qualificato, nel contesto della storia clinica del paziente e delle altre metodiche diagnostiche adoperate.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K è destinato all'uso su sezioni tissutali incluse in paraffina con specifici requisiti di fissazione. Non tutti gli antigeni richiedono smascheramento degli epitopi. Le condizioni ottimali per lo smascheramento degli epitopi vanno convalidate dall'utente, poiché dipendono dal tessuto, dalla fissazione e/o dall'anticorpo primario. Un'espressione antigenica inattesa può manifestarsi in particolare nelle neoplasie. L'interpretazione clinica di ogni sezione tissutale colorata deve includere l'analisi morfologica e la valutazione dei controlli appropriati.

Caratteristiche di rendimento

Il rendimento di Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K è stato convalidato utilizzando anticorpi primari Novocastra™ per i quali la tripsina è la tecnica di smascheramento raccomandata. Il prodotto è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta.

Riferimenti bibliografici

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadj M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Modifiche alla pubblicazione precedente

Non applicabile.

Data di pubblicazione

17 febbraio 2015

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Produkt Nr.: RE7160-K

Verwendungszweck

Für in-vitro-Diagnostik.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K ist für die enzymatische Vorbehandlung formalinfixierter, paraffineingebetteter Gewebeschnitte vor der Inkubation mit einem primären Antikörper in einem immunhistochemischen (IHC-) Verfahren bestimmt. Dieses Produkt kann für die Epitopdemaskierung mit Novocastra™ Antikörpern, für die Trypsin empfohlen wird, verwendet werden. Bekannte Ausnahmen sind , NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip, und NCL-CYCLIN D1-GM. Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Verfahrensgrundlage

Die Enzymvorbehandlung von formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten verbessert die Färbung einiger Antikörper durch die Freilegung von Epitopen in Geweben, die während der Fixierung maskiert wurden. Das erste für die Epitopdemaskierung verwendete proteolytische Enzym war Trypsin.¹ Andere proteolytische Enzyme, die für diesen Zweck verwendet werden können, sind Protease XXIV und Pepsin.² In jüngerer Zeit ist außerdem Proteinase K, die gewöhnlich bei Techniken zur in-situ-Hybridisierung verwendet wird, eingesetzt worden.

Dieses Produkt wird in einem IHC-Verfahren verwendet, das den qualitativen Nachweis von Antigenen in formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebeschnitten in mehreren aufeinander folgenden Schritten mit dazwischen liegenden Waschschritten mittels Lichtmikroskopie gestattet (die Verfahrensgrundlage der IHC-Färbung ist in den Gebrauchsanweisungen des entsprechenden Nachweissystems beschrieben). Die Epitopdemaskierung durch enzymatische Vorbehandlung wird für eine begrenzte Zahl von Antikörpern empfohlen (siehe Gebrauchsempfehlungen für den primären Antikörper). Da die optimalen Bedingungen für die Epitopdemaskierung vom Gewebe, von der Fixierung und/oder vom primärem Antikörper abhängen, sind sie vom Benutzer zu validieren.

Gelieferte Reagenzien

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym in 40 Vol.-% Glycerol, das 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,5 mit 1 mmol/l Kalziumazetat enthält.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, oberflächenaktive Substanz und 0,35% ProClin™ 950.
3. Leere Tropfflasche.

Rekonstitution, Mischen, Verdünnung, Titration

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K muss zur Vorbereitung einer Arbeitslösung im Proteinase K Buffer RE7127 verdünnt werden (siehe Proteinase K-Arbeitslösung). Der Benutzer muss solche Änderungen zuvor validieren. Eine weitere Verdünnung könnte zum Verlust der Antigenfärbung führen. Der Benutzer muss solche Änderungen zuvor validieren.

Lagerung und Stabilität

Bei 2–8 °C lagern. Nicht einfrieren. Nach Gebrauch sofort wieder bei 2–8 °C lagern. Nach Ablauf des Verfallsdatums (auf dem Behälteretikett angezeigt) darf das Produkt nicht mehr verwendet werden. Lagerbedingungen, die von den oben genannten Bedingungen abweichen, müssen vom Benutzer verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für die Instabilität dieses Produkts. Daher sind die positiven und negativen Kontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben durchzuführen.

Probenvorbereitung

Für paraffineingebettete Gewebeschnitte ist das empfohlene Fixativ 10% neutral gepuffertes Formalin.

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Enthält und Proteinase K
(<10%).

GHS08: Gesundheitsgefahr.

Signalwörter: Gefahr.

H334: Kann bei Einatmen Allergie,
asthmaartige Symptome oder
Atembeschwerden verursachen.

P261: Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/
Aerosol vermeiden.

P285: Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.

P304+341: BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden an die
frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die
das Atmen erleichtert.

P342+311: Bei Symptomen der Atemwege:
GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P501: Inhalt/Behälter zu einer Problemabfallentsorgung
zuführen.

Ein Materialsicherheits-Datenblatt ist auf Anfrage von www.LeicaBiosystems.com erhältlich.

Für geschultes Fachpersonal.

Vor und nach der Fixierung sind die Proben sowie alle Materialien, die mit ihnen in Kontakt gekommen sind, als potentiell infektiös zu behandeln und daher mit entsprechender Vorsicht zu entsorgen.³

Reagenzien dürfen niemals mit dem Mund pipettiert werden, und jeglicher Kontakt der Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten ist zu vermeiden. Falls Reagenzien oder Proben mit empfindlichen Bereichen in Kontakt gekommen sind, müssen diese mit reichlich Wasser gespült werden.

Die entsprechenden nationalen und lokalen Bestimmungen und Vorschriften zur Entsorgung potentiell giftiger Komponenten sind einzuhalten.

Die mikrobielle Verunreinigung von Reagenzien ist zu minimieren, da ansonsten eine erhöhte unspezifische Färbung auftreten kann. Falls die spezifizierten Inkubationszeiten oder –temperaturen nicht eingehalten werden, kann es zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. Jegliche Abweichungen von den angegebenen Werten müssen vom Benutzer verifiziert werden.

Verfahren

A. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Reagenzien

Siehe Gebrauchsanweisungen des primären Antikörpers.

B. Zusätzlich benötigte, aber nicht mitgelieferte Ausrüstung

1. Allgemeine immunhistochemische Laborausstattung.

C. Vorgehensweise

Vor Anwendung dieser Vorgehensweise müssen die Benutzer mit immunhistochemischen Techniken vertraut sein. Die Kombination aus Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, dem primären Antikörper und seiner Verdünnung zusammen mit dem Nachweissystem ist vom Benutzer auf einer Reihe bekannter positiver und negativer Kontrollen zu validieren.

Sofern nicht anderweitig vorgegeben, werden alle Schritte bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt. Die folgenden Schritte sind vor der Inkubation mit dem primären Antikörper durchzuführen.

1. Die Objektträger unter entionisiertem Wasser abspülen.
2. Mit Proteinase K-Arbeitslösung (siehe Proteinase K-Arbeitslösung) 5 Minuten lang inkubieren.
3. In TBS waschen.
4. Anschließend mit dem IHC-Protokoll gemäß den Gebrauchsanweisungen des Herstellers für den primären Antikörper und das Nachweissystem fortfahren.

Proteinase K-Arbeitslösung

40 µL Proteinase K Concentrate RE7126 zu 6 ml Proteinase K Buffer RE7127 hinzugeben. Die Lösung in die mitgelieferte Tropfflasche einfüllen.

Die Arbeitslösung bleibt bei Lagerung bei 2–8 °C bis zu 3 Monate lang stabil.

Qualitätskontrolle

Unterschiede bei der Gewebeparbeitung und den technischen Verfahren im Labor des Benutzers können zu signifikanten Schwankungen bei den Ergebnissen führen. Daher ist es wichtig, zusätzlich zu den folgenden Verfahren regelmäßige laborinterne Kontrollen durchzuführen. Die Kontrollen sollten mit frischen Autopsie-/Biopsie-/chirurgischen Proben vorgenommen werden, die so bald wie möglich und auf dieselbe Weise wie die Patientenprobe(n) in Formalin fixiert, behandelt und in Paraffin eingebettet worden sind.

Positive Gewebekontrolle

Zeigt korrekt vorbereitete Gewebe und korrekte Färbetechniken an. In jedem Färbelauf sollte für jeden Satz Testbedingungen/ primärer Antikörper eine positive Gewebekontrolle durchgeführt werden. Gewebe mit schwach positiver Färbung ist für die optimale Qualitätskontrolle und den Nachweis kleiner Minderungen in der Reagenzleistung besser geeignet, als ein Gewebe mit stark positiver Färbung.⁴ Informationen über das positive Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Falls das positive Kontrollgewebe keine positive Färbung nachweisen kann, sollten die mit den Testproben erzielten Ergebnisse als ungültig betrachtet werden.

Negative Gewebekontrolle

Die negative Gewebekontrolle sollte nach der positiven Gewebekontrolle erfolgen, um die Spezifität der Zielantigenmarkierung durch den primären Antikörper zu verifizieren. Informationen über das empfohlene negative Kontrollgewebe sind in den Gebrauchsanweisungen zum primären Antikörper zu finden. Alternativ bietet die Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen, die in den meisten Gewebeschnitten vorliegen, häufig Stellen für eine negative Kontrolle. Jedoch sollte dies vom Benutzer verifiziert werden. Liegt eine unspezifische Färbung vor, hat diese gewöhnlich ein diffuses Erscheinungsbild. Eine sporadische Färbung des Bindegewebes kann ebenfalls in Schnitten von übermäßig formalinfixierten Geweben beobachtet werden. Zur Bewertung der Färbeergebnisse intakte Zellen verwenden. Nekrotische oder degenerierte Zellen werden oft unspezifisch gefärbt.⁵ Falsch-positive Ergebnisse können aufgrund einer nichtimmunologischen Bindung von Proteinen oder Substratreaktionsprodukten beobachtet werden. Solche Ergebnisse können auch durch endogene Enzyme wie Pseudoperoxidase (Erythrozyten), endogene Peroxidase (Zytochrom C) oder endogenes Biotin⁶ (beispielsweise Leber, Mamma, Gehirn, Niere) hervorgerufen werden. Um eine endogene Enzymaktivität bzw. eine unspezifische Enzymbindung von einer spezifischen Immunreaktivität zu unterscheiden, können zusätzliche Patientengewebe ausschließlich mit Substratchromogen, Streptavidin-HRP bzw. markiertem Polymer plus Substratchromogen gefärbt werden. Falls im negativen Kontrollgewebe eine spezifische Färbung auftritt, sollten die Ergebnisse mit den Patientenproben als ungültig betrachtet werden.

Negative Reagenzkontrolle

Zur Beurteilung einer unspezifischen Färbung und zur besseren Bewertung einer spezifischen Färbung an der Antigenstelle ist mit einem Schnitt jedes Patientenpräparates anstelle des primären Antikörpers eine unspezifische negative Reagenzkontrolle zu verwenden.

Patientengewebe

Die gefärbten Patientenproben müssen zuletzt untersucht werden. Eine positive Färbeintensität ist im Kontext einer unspezifischen Hintergrundfärbung der negativen Reagenzkontrolle zu bewerten. Wie bei jedem immunhistochemischen Test bedeutet ein negatives Ergebnis, dass das Antigen nicht nachgewiesen wurde. Ein negatives Ergebnis bedeutet jedoch nicht notwendigerweise, dass das Antigen in den getesteten Zellen / im getesteten Gewebe nicht vorlag. Bei Bedarf sollte zur Identifizierung falsch-negativer Reaktionen eine Gruppe von Antikörpern verwendet werden.

Beschränkungen

Die Immunhistochemie ist ein mehrstufiger diagnostischer Prozess, der eine spezialisierte Ausbildung auf den folgenden Gebieten erfordert: Auswahl der entsprechenden Reagenzien; Gewebeauswahl, -fixierung und -verarbeitung; Vorbereitung des IHC-Objektträgers sowie Bewertung der Färbeergebnisse.

Die Gewebefärbung hängt von der Handhabung und Verarbeitung des Gewebes vor dem Färben ab. Unsachgemäßes Fixieren, Einfrieren, Auftauen, Waschen, Trocknen, Erwärmen, Schneiden oder eine Kontamination mit anderen Geweben oder Flüssigkeiten kann zu Artefakten, Antikörper-Trapping oder falsch-negativen Ergebnissen führen. Abweichende Ergebnisse können aufgrund von Unterschieden bei der Fixierung und Einbettung oder intrinsischen Unregelmäßigkeiten im Gewebe selbst entstehen.⁷

Eine exzessive oder unvollständige Gegenfärbung kann die korrekte Bewertung von Ergebnissen gefährden.

Die klinische Bewertung einer vorliegenden bzw. fehlenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit entsprechenden Kontrollen ergänzt und im Kontext der Krankengeschichte des Patienten und anderer diagnostischer Tests von einem qualifizierten Pathologen vorgenommen werden.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K ist zur Verwendung auf paraffineingebetteten Schnitten mit spezifischen Fixierungsanforderungen bestimmt. Nicht alle Antigene erfordern eine Epitopdemaskierung. Da die optimalen Bedingungen für die Epitopdemaskierung vom Gewebe, von der Fixierung und/oder vom primärem Antikörper abhängen, sind sie vom Benutzer zu validieren. Es kann insbesondere bei Neoplasmen zu einer unerwarteten Antigenexpression kommen. Die klinische Bewertung eines gefärbten Gewebeschnitts muss eine morphologische Analyse und die Auswertung der entsprechenden Kontrollen einschließen.

Leistungsmerkmale

Die Leistung von Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K wurde mithilfe primärer Novocastra™ Antikörper, für die Trypsin die empfohlene Demaskierungstechnik darstellt, validiert. Dieses Produkt bleibt bis zum auf dem Behälteretikett angegebenen Verfallsdatum stabil.

Literatur

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Änderungen zur vorhergehenden Ausgabe

Warnhinweise und Sicherheitsmaßnahmen.

Ausgabedatum

17 Februar 2015

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Referencia: RE7160-K

Indicaciones de uso

Para uso diagnóstico in vitro.

El producto Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K está indicado para el tratamiento enzimático de secciones de tejido fijadas con formol e incluidos en parafina, antes de la incubación con un anticuerpo primario, en un proceso inmunohistoquímico. Este producto se puede usar para recuperar los epítomos con anticuerpos Novocastra™ para los que se recomienda tripsina; excepciones conocidas a esta circunstancia son, NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-Ip, y NCL-CYCLIN D1-GM. La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Principio del procedimiento

El tratamiento enzimático previo de secciones de tejido fijadas con formol e incluidos en parafina mejora la tinción de algunos anticuerpos, al exponer los epítomos presentes en el tejido que se han enmascarado durante la fijación. La primera enzima proteolítica empleada en la recuperación de los epítomos fue la tripsina.¹ Otras enzimas proteolíticas que se pueden usar con esta finalidad son la proteasa XXIV y la pepsina.² Recientemente, se ha utilizado también habitualmente la proteinasa K en las técnicas de hibridación in situ.

Este producto se usa en un procedimiento de inmunohistoquímica, lo que permite la identificación cualitativa, mediante microscopía óptica, de antígenos en cortes fijados con formol e incluidos en parafina, mediante pasos secuenciales, con pasos intermedios de lavado (vea el Principio del método de tinción inmunohistoquímica en las instrucciones de uso del sistema de detección adecuado). La recuperación de los epítomos mediante tratamiento enzimático previo se recomienda para unos pocos anticuerpos (consulte las Recomendaciones de uso del anticuerpo primario). Las condiciones óptimas para la recuperación de los epítomos deberán ser validadas por el usuario, ya que dependen del tejido, la fijación o el anticuerpo primario.

Reactivos suministrados

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzima en glicerol al 40% v/v, que contiene Tris-HCl 10 mM, a pH 7,5, con acetato cálcico 1 mM.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Solución salina tamponada con Tris, agente tensioactivo y ProClin™ 950 al 0,35%.
3. Frasco gotero vacío.

Reconstitución, mezclado, dilución y titulación

Es necesario diluir Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K en Proteinase K Buffer RE7127 para preparar la solución de trabajo (vea la Solución de trabajo de Proteinase K). El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo. Una mayor dilución puede provocar la pérdida de tinción del antígeno. El usuario debe validar cualquier cambio de este tipo.

Almacenamiento y estabilidad

Almacénelo a una temperatura de 2 – 8 °C. No lo congele. Devuélvalo a 2 – 8 °C inmediatamente después de su uso. No lo utilice después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto. Cualesquiera condiciones de almacenamiento que no sean las especificadas deben ser verificadas por el usuario. No existe ningún signo evidente que indique la inestabilidad de este producto; por lo tanto, deberán realizarse simultáneamente controles positivos y negativos con las muestras de pacientes.

Preparación de las muestras

El fijador recomendado para secciones de tejido incluidas en parafina es formol tamponado neutro al 10%.

Advertencias y precauciones

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contiene y Proteinase K
(<10%).

GHS08: Peligro para la salud.

Palabras de advertencia:
Peligro.

H334: Puede provocar síntomas
de alergia o asma o dificultades
respiratorias en caso de inhalación.

P261: Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los
vapores/el aerosol.

P285: En caso de ventilación insuficiente, llevar equipo de
protección respiratoria.

P304+341: EN CASO DE INHALACIÓN: Si respira con
dificultad, transportar a la víctima al exterior y mantenerla
en reposo en una posición confortable para respirar.

P342+311: En caso de síntomas respiratorios: Llamar a
un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un
médico.

P501: Eliminar el contenido/el recipiente en un punto de
recogida pública de residuos especiales o peligrosos.

Está disponible una Hoja de información sobre la seguridad del material, previa petición, o en www.LeicaBiosystems.com

Para usuarios profesionales.

Las muestras, antes y después de ser fijadas, así como todos los materiales expuestos a ellas, deben manipularse como capaces de transmitir una infección, y deberán eliminarse tomando las precauciones adecuadas.³

No pipetee nunca los reactivos con la boca, y evite el contacto de la piel y de las membranas mucosas con los reactivos y las muestras. Si los reactivos o las muestras entran en contacto con zonas sensibles, lave éstas con abundante agua.

Consulte las normativas nacionales, estatales, provinciales o municipales acerca de cómo desechar cualquier componente potencialmente tóxico.

Reduzca al mínimo la contaminación microbiana de los reactivos; de lo contrario, podría producirse un aumento de la tinción no específica. Cualquier tiempo o temperatura de incubación que no sean los aquí especificadas pueden conducir a resultados erróneos. Cualquier cambio de tal naturaleza debe ser validado por el usuario.

Procedimiento

A. Reactivos necesarios que no se suministran

Vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario.

B. Equipo necesario que no se suministra

Equipo de laboratorio utilizado generalmente para inmunohistoquímica.

C. Metodología

Antes de utilizar esta metodología, los usuarios deben haber recibido formación en técnicas inmunohistoquímicas; su uso junto con Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, el anticuerpo primario, su dilución, junto con el sistema de detección, deberá ser validado por el usuario, en una serie de controles positivos y negativos conocidos.

A menos que se indique otra cosa, todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente (25 °C). Antes de la incubación con el anticuerpo primario se deben ejecutar los pasos siguientes.

1. Lave los portaobjetos en agua desionizada.
2. Incube con la solución de trabajo de Proteinase K (vea Solución de trabajo de Proteinase K) durante 5 minutos.
3. Lave con TBS.
4. Proceda con el protocolo de inmunohistoquímica conforme a las Instrucciones de uso del fabricante para el anticuerpo primario y del sistema de detección.

Solución de trabajo de Proteinase K

Añada 40 µl de Proteinase K Concentrate RE7126 a 6 ml de Proteinase K Buffer RE7127. Coloque la solución en el gotero que se suministra.

La solución de trabajo es estable durante un período de tres meses si se conserva a una temperatura de 2 –8 °C.

Control de calidad

Las diferencias en el procesamiento de los tejidos y en los procedimientos técnicos del laboratorio del usuario pueden producir una variabilidad significativa en los resultados; por ello, es necesario que éste lleve a cabo regularmente sus propios controles, además de los siguientes procedimientos. Los controles deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o quirúrgicas fijadas en formol, procesadas e incluidas en parafina lo antes posible de manera idéntica a la utilizada para la muestra o muestras del paciente o pacientes.

Control tisular positivo

Se utiliza para indicar la preparación correcta de los tejidos y las técnicas de tinción adecuadas. Debe incluirse un control tisular positivo por cada conjunto de condiciones de ensayo y anticuerpo primario, en cada tinción o serie de tinciones realizada. Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado que un tejido con una tinción positiva intensa para un control de calidad óptimo y para detectar niveles bajos de degradación del reactivo.⁴ En cuanto al tejido de control positivo recomendado, vea las Instrucciones de uso del anticuerpo primario. Si el tejido de control positivo no muestra tinción positiva, los resultados de las muestras analizadas deben considerarse no válidos.

Control tisular negativo

Debe examinarse después del control de tejido positivo, a fin de verificar la especificidad del marcado del antígeno diana por el anticuerpo primario. En cuanto al tejido de control negativo recomendado, vea las instrucciones de uso del anticuerpo primario. Como alternativa, la variedad de diferentes tipos de células presentes en la mayoría de las secciones de tejido ofrece con frecuencia lugares de control negativo, pero esto debe ser verificado por el usuario. Si aparece tinción no específica, tiene generalmente aspecto difuso. En secciones de tejido fijado excesivamente en formol puede observarse también tinción esporádica del tejido conectivo. Utilice células intactas para la interpretación de los resultados de la tinción. A menudo, las células necróticas o degeneradas quedan teñidas de forma no específica.⁵ También pueden observarse falsos positivos causados por la unión no inmunológica de proteínas o de productos de reacción del sustrato. Estos falsos positivos pueden estar causados también por enzimas endógenas tales como la pseudoperoxidasa (eritrocitos), la peroxidasa endógena (citocromo C) o la biotina endógena⁶ (por ejemplo, de hígado, mama, cerebro o riñón). Para diferenciar la actividad de las enzimas endógenas o la unión inespecífica de las enzimas de la inmunorreactividad específica, pueden teñirse otros tejidos del paciente exclusivamente con cromógeno sustrato, Streptavidin-HRP o polímeros marcados, y con cromógeno-sustrato, respectivamente. Si se produce tinción específica del control tisular negativo, los resultados de las muestras de los pacientes deben considerarse no válidos.

Control de reactivo negativo

Utilice un control de reactivo negativo no específico en lugar del anticuerpo primario con una sección de cada muestra del paciente, a fin de evaluar la tinción no específica y obtener una mejor interpretación de la tinción específica en el lugar en que se encuentra el antígeno.

Tejido del paciente

Examine, por último, las muestras de paciente teñidas. La intensidad de la tinción positiva debe valorarse en el contexto de cualquier tinción de fondo no específica del control de reactivo negativo. Como con cualquier prueba inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que no se ha detectado antígeno, y no que el antígeno esté ausente en las células o tejido probados. Si es necesario, use un panel de anticuerpos para identificar falsas reacciones negativas.

Limitaciones

La inmunohistoquímica es un proceso de diagnóstico en varias fases que abarca: formación especializada en la selección de los reactivos apropiados; selección, fijación y procesamiento de tejidos; preparación del portaobjeto para IHQ; e interpretación de los resultados de la tinción.

La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento del tejido previos a la tinción. Una fijación, congelación, descongelación, lavado, secado, calentamiento o seccionamiento incorrectos, o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede generar artefactos, atrapamiento del anticuerpo o falsos negativos. La aparición de resultados incoherentes puede deberse a variaciones en los métodos de fijación y de inclusión, o a irregularidades inherentes al tejido.⁷

Una contratinción excesiva o incompleta puede poner en peligro la interpretación correcta de los resultados.

La interpretación clínica de cualquier tinción o de su ausencia se debe complementar con estudios morfológicos utilizando los controles adecuados, y un patólogo cualificado debe evaluarla en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

El empleo del producto Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K está indicado en cortes incluidos en parafina, con requisitos de fijación específicos. No todos los antígenos requieren la recuperación de los epitopos. Las condiciones óptimas para la recuperación de los epitopos deberán ser validadas por el usuario, ya que dependen del tejido, la fijación y/o el anticuerpo primario.

Puede producirse una expresión inesperada del antígeno, especialmente en las neoplasias. La interpretación clínica de cualquier sección de tejido teñida debe incluir un análisis morfológico y la evaluación de los controles apropiados.

Características del rendimiento

La eficacia de Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K se ha validado con anticuerpos primarios Novocastra™ para los que la tripsina es la técnica de recuperación recomendada. Este producto es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del producto.

Bibliografía

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Correcciones a la publicación anterior

Advertencias y precauciones.

Fecha de publicación

17 de febrero de 2015

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

N.º do produto: RE7160-K

Utilização prevista

Para utilização em diagnósticos in vitro.

O produto Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K foi concebido para ser utilizado no pré-tratamento enzimático de secções de tecido fixadas em formol e envolvidas em parafina, antes da sua incubação com um anticorpo primário num procedimento imunohistoquímico (IHQ). Este produto pode ser empregado para a recuperação de epítomos com anticorpos Novocastra™, para o qual se recomenda a tripsina, com as seguintes excepções já estabelecidas: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL- α 1, e NCL-CYCLIN D1-GM. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

Princípio do procedimento

O pré-tratamento enzimático de secções de tecido fixadas em formol e envolvidas em parafina melhora o nível de coloração de alguns anticorpos, através da exposição de epítomos, contidos no tecido, os quais tinham permanecido dissimulados durante a fixação. A primeira enzima proteolítica empregada para a recuperação de epítomos foi a tripsina¹. Outras enzimas proteolíticas que se podem empregar para este fim incluem a Protease XXIV e a Pepsina². Mais recentemente também se tem empregado a Proteinase K, uma enzima normalmente utilizada em técnicas de hibridização in situ.

Este produto é utilizado em procedimentos de IHQ, os quais permitem a identificação qualitativa de antígenos, por microscopia óptica, em secções de tecido fixado com formalina e envolvido em parafina, através de etapas sequenciais intercaladas com etapas de lavagem (consultar as Instruções de utilização do sistema de detecção apropriado para obter informações sobre o princípio do procedimento da coloração IHQ). Recomenda-se a recuperação de epítomos por pré-tratamento enzimático para um número limitado de anticorpos (consultar a secção Recomendações sobre a utilização para obter informações sobre o anticorpo primário). As condições ideais para a recuperação de epítomos devem ser validadas pelo utilizador, pois que tais condições variam com os tecidos, fixação e/ou anticorpo primário.

Reagentes fornecidos

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzima em glicerina a 40% v/v contendo 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, com 1 mM de acetato de cálcio.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Soro tamponado com tris, um produto tenso-activo e ProClin™ 950 a 0,35%.
3. Frasco conta-gotas vazio.

Reconstituição, mistura, diluição, titulação

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K requer a diluição de Proteinase K Buffer RE7127 para a preparação de uma solução de trabalho (consultar a secção Solução de trabalho com protease K). O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza. Qualquer diluição adicional poderá resultar na perda de coloração do antígeno. O utilizador deve validar quaisquer alterações dessa natureza.

Armazenamento e estabilidade

Armazenar a 2–8 °C. Não congelar. Retornar à temperatura de 2–8 °C imediatamente após a utilização. Não utilizar após o prazo de validade indicado no rótulo do produto. As condições de armazenamento que diferirem das que se encontram especificadas devem ser verificadas pelo utilizador. Não há sinais óbvios que indiquem a instabilidade deste produto, portanto os controlos positivos e negativos devem ser activados em simultâneo com as amostras do doente.

Preparação das amostras

O fixador recomendado é formol tamponado neutro a 10% para secções de tecido envolvidas em parafina.

Avisos e precauções

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Contém Enzyme Proteinase K
($<10\%$).

GHS08: Perigo para a saúde.

Palavras-sinal: Perigo.

H334: Quando inalado, pode
provocar sintomas de alergia ou de
asma ou dificuldades respiratórias.

P261: Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/
vapores/aerossóis.

P285: Em caso de ventilação inadequada, usar protecção
respiratória.

P304+P341: EM CASO DE INALAÇÃO: em caso de
dificuldade respiratória, retirar a vítima para uma zona ao
ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não
dificulte a respiração.

P342+P311: Em caso de sintomas respiratórios: contacte
um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um
médico.

P501: Eliminar o conteúdo/recipiente em um local
autorizado para a recolha de resíduos perigosos ou
especiais.

Encontra-se disponível uma Ficha de Dados de Segurança do Material, mediante pedido ou através do site www.LeicaBiosystems.com

Apenas para utilizadores profissionais.

As amostras, antes e depois da sua fixação, bem como todos os materiais expostos às mesmas, devem ser processados tal como se tivessem a capacidade de transmitir infecções e devem ser descartados com as devidas precauções³.

Nunca pipetar os reagentes com a boca e evitar o contacto da pele e membranas mucosas com os reagentes e amostras. Caso os reagentes ou amostras entrem em contacto com áreas sensíveis, lavar com grandes quantidades de água.

Consultar a legislação nacional ou europeia em relação ao descarte de quaisquer componentes potencialmente tóxicos.

Minimizar a contaminação microbiana dos reagentes, para evitar a possibilidade do aumento da coloração não específica. Os períodos de incubação ou temperaturas diferentes dos que foram especificados poderão dar azo a resultados errados. Todas as alterações desse tipo devem ser validadas pelo utilizador.

Procedimento

A. Reagentes necessários não fornecidos

Consultar as Instruções de utilização relativas ao anticorpo primário.

B. Equipamento necessário não fornecido

1. Equipamento geral de laboratório de imunohistoquímica.

C. Metodologia

Antes de adoptar esta metodologia, o utilizador deve receber formação em técnicas imunohistoquímicas, e a utilização combinada de Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, do anticorpo primário, e a sua diluição, juntamente com o sistema de detecção, devem ser validados pelo utilizador numa série de controlos positivos e negativos já conhecidos.

A não ser indicação em contrário, todas as etapas devem ser efectuadas à temperatura ambiente (25 °C). Devem adoptar-se as etapas que se seguem antes de se efectuar a incubação com o anticorpo primário.

1. Lavar as lâminas em água desionizada.
2. Incubar com a solução de trabalho de Proteinase K (consultar Solução de trabalho de Proteinase K) durante 5 minutos.
3. Lavar em TBS.
4. Continuar a efectuar o protocolo IHQ em conformidade com as instruções de utilização emitidas pelo fabricante para o anticorpo primário e para o sistema de detecção.

Solução de trabalho de Proteinase K

Adicionar 40 µl de Proteinase K Concentrate RE7126 a 6 ml of Proteinase K Buffer RE7127. Colocar a solução no frasco conta-gotas fornecido. A solução de trabalho permanece estável durante um máximo de 3 meses, se for armazenada a 2–8 °C.

Controlo da qualidade

As diferenças entre os diferentes métodos e técnicas de processamento de tecidos no laboratório do utilizador podem causar uma grande variabilidade de resultados, requerendo a realização frequente de controlos internos suplementares aos procedimentos que se seguem. Os controlos devem ser amostras de autópsia/biopsia/cirurgia frescas, fixadas em formol, processadas e envolvidas em cera parafínica logo que possível, da mesma maneira que a(s) amostra(s) do(s) doente(s).

Controlo de tecido positivo

Usado para assinalar os tecidos correctamente preparados e as técnicas de coloração indicadas. Por cada conjunto de condições de testes, em cada processo de coloração, deve incluir-se um controlo de tecido positivo. Os tecidos com uma coloração positiva fraca são mais indicados do que os têm uma coloração positiva forte para proporcionarem um controlo de qualidade óptimo, bem como para detectar níveis reduzidos de degradação dos reagentes⁴. Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo positivo recomendado. Se o controlo de tecido positivo não demonstrar uma coloração positiva, os resultados obtidos com as amostras de testes devem ser considerados inválidos.

Controlo de tecido negativo

Este deve ser examinado depois do controlo de tecido positivo, para verificar a especificidade da marcação do antígeno objectivado pelo anticorpo primário. Consultar as Instruções de utilização do anticorpo primário para obter informações sobre o tecido de controlo negativo recomendado. Alternativamente, a variedade de diferentes tipos de células presentes na maioria das secções de tecidos oferece muitas vezes locais de controlo negativo, mas isto deve ser verificado pelo utilizador. A coloração não específica, caso ocorra, tem geralmente um aspecto difuso. A coloração esporádica do tecido conjuntivo pode também ter lugar em secções de tecido excessivamente fixado em formol. Devem utilizar-se células intactas para a interpretação dos resultados da coloração. As células necróticas ou degeneradas causam muitas vezes uma coloração não específica⁵. Podem verificar-se resultados falso-positivos devido à ligação não imunológica de proteínas ou de produtos da reacção do substrato. Esses resultados podem também ser causados por enzimas endógenas tais como a pseudoperoxidase (eritrócitos), a peroxidase endógena (citocromo C), ou a biotina endógena⁶ (ex. no fígado, mama, cérebro ou rim). Para diferenciar entre a actividade das enzimas endógenas ou as ligações não específicas de enzimas e as imunoreactividades específicas, podem colorir-se tecidos adicionais dos doentes exclusivamente com substrato cromogénio, Streptavidin-HRP ou com polímero etiquetado e substrato-cromogénio, respectivamente. Se ocorrer a coloração específica no controlo de tecido negativo, os resultados dos testes feitos com as amostras do doente devem ser considerados inválidos.

Controlo de reagente negativo

Utilizar um controlo de reagente negativo não específico em vez do anticorpo primário com uma secção de cada amostra de doente, para avaliar a coloração não específica e permitir uma melhor interpretação da coloração específica no local do antígeno.

Tecido do doente

Examinar as amostras coloridas do doente em último lugar. A intensidade da coloração positiva deve ser avaliada dentro do contexto de qualquer coloração não específica de fundo do controlo de reagente negativo. Tal como com qualquer teste imunohistoquímico, um resultado negativo significa que o antígeno não foi detectado, e não que o antígeno se encontrava ausente das células ou tecido analisados. Se necessário, deve utilizar-se um painel de anticorpos para identificar reacções falso-negativas.

Limites

A imunohistoquímica é um processo diagnóstico em múltiplas etapas, que consta de: uma formação especializada na selecção dos reagentes apropriados; selecção, fixação e processamento de tecidos; preparação das lâminas de IHQ; e interpretação dos resultados das colorações.

A coloração de tecidos depende do seu manuseamento e processamento antes da sua coloração. A fixação, congelação, descongelação, lavagem, secagem, aquecimento ou corte incorrectos das amostras, ou a sua contaminação com outros tecidos ou fluidos, pode produzir artefactos, retenção de anticorpos, ou resultados falso-negativos. Os resultados inconsistentes podem dever-se a variações nos métodos de fixação e envolvimento, ou a irregularidades inerentes ao tecido⁷.

Uma contrastação excessiva ou incompleta pode comprometer a devida interpretação dos resultados.

A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos empregando os devidos controlos, e deve ser avaliada por um patologista qualificado, dentro do contexto do historial clínico do doente e de outros testes de diagnóstico.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K serve para ser utilizado em secções envolvidas em parafina com requisitos especiais de fixação. Nem todos os antígenos requerem a recuperação de epítomos. As condições ideais para a recuperação de epítomos devem ser validadas pelo utilizador, pois que tais condições variam com os tecidos, fixação e/ou anticorpo primário. Pode ocorrer uma expressão inesperada de antígeno, especialmente em neoplasmas. A interpretação clínica de qualquer secção de tecido colorido deverá incluir a análise morfológica e a avaliação de controlos apropriados.

Características de desempenho

O desempenho da Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K foi validado através da utilização de anticorpos primários Novocastra™, para os quais a tripsina é a técnica de recomendação recomendada. Este produto é estável até ao prazo de validade indicado no seu rótulo.

Bibliografia

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7:161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Emendas da edição anterior

Avisos e precauções.

Data de emissão

17 de Fevereiro de 2015

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Produktnr.: RE7160-K

Avsedd användning

För in vitro diagnostisk användning.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K är avsedd för enzymatisk förbehandling av formalinfixerade paraffinbäddade vävnadssnitt före inkubation med en primär antikropp i en immunhistokemisk (IHC) procedur. Denna produkt kan användas för epitopäterving med Novocastra™ antikroppar för vilka rekommenderas trypsin, kända undantag är , NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p, and NCL-CYCLIN D1-GM. Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

Metodens princip

Enzymförbehandling av formalinfixerade paraffinbäddade vävnadssnitt förbättrar färgningen av vissa antikroppar genom att exponera epitoperna inom vävnaden som har maskerats vid fixering. Den första proteolytiska enzymen som användes för epitopäterving var trypsin.¹ Andra proteolytiska enzymer som kan användas i detta ändamål omfattar Protease XXIV och Pepsin.² På senare tid har Proteinase K som vanligtvis används för in situ hybridiseringstekniker också använts.

Denna produkt används i en IHC procedur som tillåter kvalitativ identifikation med ljusmikroskopi av antigener i sektioner av formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad via sekvenssteg med inlagda tvättsteg (för IHC färgning Metodens princip se Instruktioner vid användning för lämpligt detektionssystem). Epitopäterving genom enzymatisk förbehandling rekommenderas för ett begränsat antal antikroppar (se primära antikroppar Rekommendationer vid användning). Optimala förhållanden för epitopäterving bör kontrolleras av användaren eftersom dessa beror på vävnad, fixering och/eller primär antikropp.

Tillhandahållna reagens

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym i 40 % v/v glycerol innehållande 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, med 1 mM kalcium acetat.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Trisbuffrad koksaltlösning med ytaktivt medel och 0,35 % ProClin™ 950.
3. Töm pipettflaska.

Rekonstitution, blandning, spädning, titrering

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K kräver spädning i Proteinase K Buffer RE7127 för att bereda en arbetslösning (se Proteinase K brukslösning). Användaren måste kontrollera sådana förändringar. Fortsatt spädning kan resultera i förlust av antigenfärgning. Användaren måste kontrollera sådana förändringar.

Förvaring och stabilitet

Förvara vid 2–8 °C. Frysa inte. Återgå till 2–8 °C direkt efter användning. Använd inte efter det utgångsdatum som anges på produktens etikett. Förvaringsförhållanden som skiljer sig från de ovannämnda måste kontrolleras av användaren. Det finns inga tydliga tecken på att denna produkt är ostabil därför bör positiva och negativa kontroller köras samtidigt med patientprover.

Preparation av prov

Det rekommenderade fixeringsmedlet för paraffinbäddade vävnadssnitt är 10 % neutralbuffrad formalin.

Varningar och försiktighetsåtgärder

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Innehåller och Proteinase K
(<10%).

GHS08: Hälsofara.

Signalord: Fara.

H334: Kan orsaka
allergi-eller astmasymtom eller
andningssvårigheter vid inandning.

P261: Undvik att andas damm/rök/gaser/dimma/ångor/
sprej.

P285: Använd andningsskydd vid otillräcklig ventilation.

P304+341: VID INANDNING: Vid andningsbesvär, flytta
personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en
ställning som underlättar andningen.

P342+311: Vid besvär i luftvägarna: Kontakta
GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.

P501: Innehållet/Behållaren lämnas till insamlingsställe för
farligt avfall.

Materialsäkerhetsdatablad finns att få på begäran eller från www.LeicaBiosystems.com

För professionella användare.

Prover, innan och efter fixering samt all material som utsätts för dem bör hanteras som om de överför infektioner och kastas enligt gällande försiktighetsåtgärder.³

Pipettera aldrig via mun och se till att hud och slemhinnor inte kommer i kontakt med reagens och prover. Om reagens eller prover kommer i kontakt med känsliga områden skall du tvätta med rikliga mängder vatten.

Angående kassering av potentiellt toxiska komponenter hänvisas till nationella eller lokala bestämmelser.

Minimera mikrobisk kontaminering av reagens annars kan en ökning av ospecifik färgning ske. Inkubationstider eller temperaturer som skiljer sig från dem som specificeras kan ge felaktiga resultat. Alla sådana förändringar måste kontrolleras av användaren.

Procedur

A. Reagens som krävs men inte tillhandahålls

Se primär antikropp Instruktioner vid användning.

B. Utrustning som krävs men inte tillhandahålls

Allmän immunhistokemisk laboratorieutrustning.

C. Metod

Innan denna metod används bör användare utbildas i immunhistokemiska tekniker och användningen i kombination med Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primär antikropp, dess spädning, tillsammans med detektionssystemet bör kontrolleras av användaren med en serie kända positiva och

negativa kontroller.

Om inte annat anges utförs alla steg vid rumstemperatur (25 °C). Följande steg bör tas före inkubation med primär antikropp.

1. Tvätta objektglaset i avjoniserat vatten.
2. Inkubera med Proteinase K brukslösning (se Proteinase K brukslösning) i 5 minuter.
3. Tvätta i TBS.
4. Fortsätt med IHC protokoll enligt tillverkarens instruktioner för Användning av primär antikropp och detektionssystem.

Proteinase K brukslösning

Tillsätt 40µl Proteinase K Concentrate RE7126 till 6ml Proteinase K Buffer RE7127. Ladda lösningen i pipettflaskan som medföljer. Brukslösningen håller sig stabil i upp till 3 månader om den förvaras vid 2–8 °C.

Kvalitetskontroll

Skillnader i vävnadsbehandling och tekniska metoder i användarens laboratorium kan ge stor variation i resultaten vilket kan göra det nödvändigt att genomföra regelbundna interna kontroller utöver följande metoder. Kontroller bör vara färskas obduktions-/biopsi-/kirurgi prover som snarast möjligt formalinfixeras, bearbetas och paraffinbäddas på samma sätt som patientprover.

Positiv vävnadskontroll

Används för att ange korrekt förberedda vävnader och rätt färgningstekniker. En positiv vävnadskontroll bör ingå i varje uppsättning av testförhållanden/primär antikropp vid varje färgningskörning. En vävnad med svag positiv färgning är mer passande för optimal kvalitetskontroll och för att upptäcka låga nivåer av reagensdegradering än en vävnad med stark positiv färgning.⁴ För rekommenderad positiv kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning. Om den positiva vävnadskontrollen misslyckas med att uppvisa positiv färgning bör resultat med testproverna anses vara ogiltiga.

Negativ vävnadskontroll

Bör undersökas efter den positiva vävnadskontrollen för att fastställa specificiteten för märkningen av målantigenet med den primära antikroppen. För rekommenderad negativ kontrollvävnad se primär antikropp Instruktioner vid användning. Alternativt ger ofta en mängd olika celltyper som finns i de flesta vävnadssnitt negativa kontrollområden men detta bör kontrolleras av användaren. Ospezifisk färgning, om det förekommer, har ofta ett diffust utseende. Sporadisk färgning av bindväv kan också observeras i snitt från överflödigt formalinfixerade vävnader. Använd intakta celler för tolkning av färgningsresultat. Nekrotiska eller degenererade celler färgar ofta ospecifikt.⁵ Falskt positiva resultat kan ses p.g.a. icke-immunologisk bindning av proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan också orsakas av endogena enzymer som pseudoperoxidas (erythrocyter), endogent peroxidas (cytokrom C), eller endogent biotin6 (t.ex. lever, bröst, hjärna, njure). För att skilja endogen enzymaktivitet eller ospecifik enzymbindning från specifik immunreaktivitet kan ytterligare patientvävnader färgas exklusivt med respektive substratkromogen eller Streptavidin-HRP eller märkt polymer och substratkromogen. Om specifik färgning sker i den negativa vävnadskontrollen bör resultat med patientprover anses vara ogiltiga.

Negativ reagenskontroll

Använd en ospecifik negativ reagenskontroll istället för den primära antikroppen med ett snitt från varje patientprov för att utvärdera ospecifik färgning och tillåta bättre tolkning av specifik färgning på antigenområdet.

Patientvävnad

Undersök färgade patientprover sist. Positiv färgningsintensitet bör utvärderas inom ramen för all ospecifik bakgrunds-färgning av den negativa reagenskontrollen. Som vid alla immunhistokemiska tester betyder ett negativt resultat att antigenet inte upptäcktes, inte att det inte förekom i de analyserade cellerna/vävnaderna. Använd vid behov en antikroppspanel för att identifiera falskt negativa reaktioner.

Begränsningar

Immunhistokemi är en diagnostisk process i flera steg som kräver specialiserad utbildning i urvalet av lämpliga reagens; val av vävnad, fixering och bearbetning; förberedelse av IHC-objektglaset samt tolkning av färgningsresultaten.

Vävnadsfärgning är beroende av hantering och bearbetning av vävnaden före färgningen. Felaktig fixering, nedfrysning, upptining, tvättning, torkning, uppvärmning, snittning eller kontaminering med andra vävnader eller vätskor kan framställa artefakter, infångande av antikroppar eller falskt negativa resultat. Motsägelsefulla resultat kan bero på variationer av fixerings- och inbäddningsmetoder eller på naturliga oregelbundenheter inom vävnaden.⁷

Överflödigt eller ofullständig kontrastfärgning kan äventyra korrekt tolkning av resultat.

Den kliniska tolkningen av all färgning eller dess frånvaro bör kompletteras med morfologiska undersökningar som använder korrekta kontroller och utvärderas av kvalificerad patolog inom ramen för patientens kliniska anamnes och andra diagnostiska tester.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K är avsedd att användas på paraffinbäddade sektioner med specifika fixeringskrav. Det är inte alla antigen som kräver epitopatervinning. Optimala förhållanden för epitopatervinning bör kontrolleras av användaren eftersom dessa beror på vävnad, fixering och/eller primär antikropp. Övåntat antigenuttryck kan ske, speciellt i neoplasmer. Morfologisk analys och utvärdering av lämpliga kontroller måste ingå i den kliniska tolkningen av alla färgade vävnadssnitt.

Prestanda

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K prestanda har kontrollerats med Novocastra™ primära antikroppar för vilka trypsin är den rekommenderade återvinningstekniken. Denna produkt är stabil fram till utgångsdatumet på produktens etikett.

Bibliografi

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadj M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Rättelser av tidigare utgivning

Varningar och försiktighetsåtgärder.

Utgivningsdatum

17 februari 2015

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Κωδικός είδους: RE7160-K

Χρήση για την οποία προορίζεται

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

Το Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K προορίζεται για την ενζυμική προεπεξεργασία τομών ιστού μονιμοποιημένων με φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη πριν από την επώαση με ένα πρωτοταγές αντίσωμα σε μια ανοσοϊστοχημική (IHC) διαδικασία. Το προϊόν αυτό είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί για ανάκτηση επιτόπου με αντισώματα Novocastra™, για τα οποία συνιστάται η θρυψίνη. Γνωστές εξαιρέσεις σε αυτό είναι τα: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-IV, και NCL-CYCLIN D1-GM. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

Αρχή της διαδικασίας

Η ενζυμική προεπεξεργασία τομών ιστού μονιμοποιημένων με φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη βελτιώνει τη χρώση μερικών αντισωμάτων με έκθεση επιτόπων εντός του ιστού, οι οποίοι έχουν συγκαλυφθεί κατά τη διάρκεια της μονιμοποίησης. Το πρώτο πρωτεολυτικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για ανάκτηση επιτόπου ήταν η θρυψίνη.¹ Άλλα πρωτεολυτικά ένζυμα που είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για το σκοπό αυτό περιλαμβάνουν την πρωτεάση XXIV και την πεψίνη.² Πιο πρόσφατα, έχει χρησιμοποιηθεί επίσης η πρωτεϊνάση K, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως σε τεχνικές in situ υβριδισμού.

Το προϊόν αυτό χρησιμοποιείται σε μια ανοσοϊστοχημική (IHC) διαδικασία, η οποία επιτρέπει την ποιοτική ταυτοποίηση με μικροσκοπία φωτός των αντιγόνων σε τομές ιστού μονιμοποιημένου με φορμόλη και εγκλεισμένου σε παραφίνη, μέσω διαδοχικών βημάτων με παρεμβλλόμενα βήματα πλύσης (για την Αρχή της διαδικασίας της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, δείτε τις οδηγίες χρήσης του κατάλληλου συστήματος ανίχνευσης). Ανάκτηση επιτόπου με ενζυμική προεπεξεργασία συνιστάται για περιορισμένο αριθμό αντισωμάτων (δείτε την ενότητα Συστάσεις για τη χρήση του πρωτοταγούς αντισώματος). Οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάκτηση επιτόπου πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη, καθώς αυτές εξαρτώνται από τον ιστό, τη μονιμοποίηση ή/και το πρωτοταγές αντίσωμα.

Παρεχόμενα αντιδραστήρια

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Ένζυμο σε 40% v/v γλυκερόλη που περιέχει 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, με 1 mM οξικό ασβέστιο.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα Tris, επιφανειοδραστικός παράγοντας και 0,35% ProClin™ 950.
3. Κενή σταγονομετρική φιάλη.

Αναστολαση, ανάμειξη, αραιώση, τιτλοδότηση

Το Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K απαιτεί αραιώση στο Proteinase K Buffer RE7127 για την παρασκευή ενός διαλύματος εργασίας (δείτε την ενότητα Διάλυμα εργασίας της πρωτεϊνάσης K). Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή. Περαιτέρω αραιώση ενδέχεται να έχει ως αποτέλεσμα απώλεια χρώσης του αντιγόνου. Ο χρήστης πρέπει να επικυρώσει τυχόν τέτοια αλλαγή.

Φύλαξη και σταθερότητα

Φυλάσσετε στους 2–8 °C. Μην καταψύχετε. Επαναφέρετε στους 2–8 °C αμέσως μετά τη χρήση. Μη χρησιμοποιείτε μετά την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος. Τυχόν συνθήκες φύλαξης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται πρέπει να επαληθεύονται από το χρήστη. Δεν υπάρχουν εμφανή σημεία που να υποδεικνύουν αστάθεια του προϊόντος αυτού, επομένως πρέπει να αναλύονται θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες ταυτόχρονα με τα δείγματα των ασθενών.

Παρασκευή δείγματος

Το συνιστώμενο μονιμοποιητικό είναι ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 10% για τομές ιστού εγκλεισμένες σε παραφίνη.

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Περιέχει και Proteinase K (<10%).

GHS08: Κίνδυνος για την υγεία.

Προειδοποιητές λέξεις: Κίνδυνος.

H334: Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής.

P261: Αποφεύγετε να αναπνεύετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα.

P285: Σε περίπτωση ανεπαρκούς αερισμού, να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας της αναπνοής.

P304+341: ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Εάν ο παθών έχει δύσπνοια, μεταφέρετέ τον στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή.

P342+311: Εάν παρουσιάζονται αναπνευστικά συμπτώματα: Καλέστε το KENTPO.

ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή ένα γιατρό.

P501: Διάθεση του περιεχομένου/περιέκτη σε χώρο συλλογής επικινδύνων ή ειδικών αποβλήτων.

Δελτίο δεδομένων ασφαλείας υλικού διατίθεται κατόπιν αιτήματος ή από τη διεύθυνση www.LeicaBiosystems.com

Για επαγγελματίες χρήστες.

Τα δείγματα, πριν και μετά τη μονιμοποίηση, καθώς και όλα τα υλικά που εκτίθενται σε αυτά, πρέπει να υποβάλλονται σε χειρισμό ως δυνητικά μετάδοσης λοίμωξης και να απορρίπτονται με κατάλληλες προφυλάξεις.³

Μην αναρροφάτε ποτέ με πιπέτα τα αντιδραστήρια με το στόμα και αποφεύγετε την επαφή του δέρματος και των βλεννογόνων με αντιδραστήρια και δείγματα. Εάν τα αντιδραστήρια ή τα δείγματα έλθουν σε επαφή με ευαίσθητες περιοχές, πλύνετε με άφθονες ποσότητες νερού.

Συμβουλευτείτε τους ομοσπονδιακούς, πολιτειακούς ή τοπικούς κανονισμούς για απόρριψη τυχόν δυνητικών τοξικών συστατικών. Ελαχιστοποιήστε τη μικροβιακή μόλυνση των αντιδραστηρίων, διότι ενδέχεται να συμβεί αύξηση της μη ειδικής χρώσης. Χρόνοι ή θερμοκρασίες επώασης διαφορετικές από εκείνες που καθορίζονται ενδέχεται να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα. Τυχόν τέτοια μεταβολή πρέπει να επικυρώνεται από το χρήστη.

Διαδικασία

A. Αντιδραστήρια που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος.

B. Εξοπλισμός που απαιτείται αλλά δεν παρέχεται

Γενικός εργαστηριακός εξοπλισμός ανοσοϊστοχημείας.

Γ. Μεθοδολογία

Πριν από την εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής, οι χρήστες πρέπει εκπαιδευτούν σε ανοσοϊστοχημικές τεχνικές και η χρήση σε συνδυασμό του Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, του πρωτοταγούς αντισώματος, της αραιώσής του, μαζί με το σύστημα ανίχνευσης πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη σε σειρά γνωστών θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

Εκτός εάν υποδεικνύεται διαφορετικά, όλα τα βήματα εκτελούνται σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C). Τα ακόλουθα βήματα πρέπει να εκτελούνται πριν από την επώαση με το πρωτοταγές αντίσωμα.

1. Πλύνετε τις αντικειμενοφόρους πλάκες με αποιονισμένο νερό.
2. Επώαστε με διάλυμα εργασίας της πρωτεϊνάσης K (δείτε την ενότητα Διάλυμα εργασίας της πρωτεϊνάσης K) επί 5 λεπτά.
3. Πλύνετε σε TBS.
4. Προχωρήστε με το πρωτόκολλο ανοσοϊστοχημείας (IHC) σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης των κατασκευαστών για το πρωτοταγές αντίσωμα και το σύστημα ανίχνευσης.

Διάλυμα εργασίας της πρωτεϊνάσης K

Προσθέστε 40 μl του Proteinase K Concentrate RE7126 σε 6 ml του Proteinase K Buffer RE7127. Γεμίστε τη σταγονομετρική φιάλη που παρέχεται με το διάλυμα.

Το διάλυμα εργασίας είναι σταθερό επί έως ³ μήνες εφόσον φυλάσσεται στους 2–8 °C.

Ποιοτικός έλεγχος

Τυχόν διαφορές στην επεξεργασία των ιστών και τις τεχνικές διαδικασίες στο εργαστήριο του χρήστη ενδέχεται να προκαλέσουν σημαντική μεταβλητότητα στα αποτελέσματα, καθιστώντας αναγκαία την τακτική εκτέλεση εσωτερικών ελέγχων επιπλέον των ακόλουθων διαδικασιών. Οι μάρτυρες θα πρέπει να είναι φρέσκα δείγματα νεκροψίας/βιοψίας/χειρουργικά δείγματα, τα οποία είναι μονιμοποιημένα με φορμόλη, επεξεργασμένα και εγκλεισμένα σε κηρό παραφίνης, το συντομότερο δυνατό με τον ίδιο τρόπο με το(α) δείγμα(τα) του ασθενούς.

Θετικός μάρτυρας ιστού

Χρησιμοποιείται για να υποδεικνύει σωστά παρασκευασμένους ιστούς και σωστές τεχνικές χρώσης. Θα πρέπει να περιλαμβάνεται ένας θετικός μάρτυρας ιστού για κάθε σύνολο συνθηκών εξέτασης/πρωτοταγούς αντισώματος σε κάθε εκτέλεση χρώσης. Ένας ιστός με ασθενή θετική χρώση είναι πιο κατάλληλος από έναν ιστό με ισχυρή θετική χρώση για βέλτιστο ποιοτικό έλεγχο και για την ανίχνευση πολύ μικρών επιπέδων τυχόν αποδόμησης των αντιδραστηρίων.⁴ Για τον συνιστώμενο ιστό θετικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Εάν ο θετικός μάρτυρας ιστού δεν παρουσιάζει θετική χρώση, τα αποτελέσματα με τα δείγματα της εξέτασης θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός μάρτυρας ιστού

Θα πρέπει να εξετάζεται μετά τον θετικό μάρτυρα ιστού για την επαλήθευση της ειδικότητας της επισημάνσης του αντιγόνου-στόχου από το πρωτοταγές αντίσωμα. Για το συνιστώμενο ιστό αρνητικού μάρτυρα, δείτε τις οδηγίες χρήσης του πρωτοταγούς αντισώματος. Εναλλακτικά, η ποικιλία διαφόρων κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στις περισσότερες τομές ιστών παρέχει συχνά θέσεις αρνητικού μάρτυρα, αλλά αυτό πρέπει να επαληθεύεται από το χρήστη. Μη ειδική χρώση, εάν υπάρχει, έχει συνήθως διάχυτη εμφάνιση. Ενδέχεται να παρατηρηθεί σποραδική χρώση του συνδεδεικού ιστού σε τομές από ιστούς που έχουν μονιμοποιηθεί με υπερβολική ποσότητα φορμόλης. Χρησιμοποιείτε άθικτα κύτταρα για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης. Νεκρωτικά ή εκφυλισμένα κύτταρα παρουσιάζουν συχνά μη ειδική χρώση.⁵ Ενδέχεται να παρατηρηθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω μη ανοσολογικής δέσμευσης των πρωτεϊνών ή των προϊόντων αντίδρασης του υποστρώματος. Ενδέχεται επίσης να προκληθούν από ενδογενή ένζυμα, όπως η ψευδοϊπεροξειδάση (ερυθροκύτταρα), η ενδογενής υπεροξειδάση (κυτόχρωμα C) ή η ενδογενής βιοτίνη⁶ (π.χ. ήπαρ, μαστός, εγκέφαλος, νεφρός). Για τη διαφοροποίηση της ενδογενούς ενζυμικής δραστηριότητας ή της μη ειδικής δέσμευσης των ενζύμων από ειδική ανοσοαντιδραστητικότητα, είναι δυνατό να χρωματιστούν αποκλειστικά επιπλέον ιστοί ασθενών με υπόστρωμα-χρωμογόνο, στρεπταβιδίνη-HRP ή σημειωμένο πολυμερές και υπόστρωμα-χρωμογόνο, αντίστοιχα. Εάν παρουσιαστεί ειδική χρώση στον αρνητικό μάρτυρα ιστού, τα αποτελέσματα με τα δείγματα ασθενούς θα πρέπει να θεωρούνται άκυρα.

Αρνητικός μάρτυρας αντιδραστηρίου

Χρησιμοποιείτε έναν μη ειδικό αρνητικό μάρτυρα αντιδραστηρίου αντί του πρωτοταγούς αντισώματος με μια τομή κάθε δείγματος ασθενούς για την αξιολόγηση της μη ειδικής χρώσης και για να επιτρέπεται καλύτερη ερμηνεία της ειδικής χρώσης στη θέση του αντιγόνου.

Ιστός ασθενούς

Εξετάστε τελευταία τα κεχρωσμένα δείγματα ασθενούς. Η ένταση της θετικής χρώσης θα πρέπει να εκτιμάται στα πλαίσια τυχόν μη ειδικής χρώσης υποβάθρου του αρνητικού μάρτυρα αντιδραστηρίου. Όπως συμβαίνει με οποιαδήποτε ανοσοϊστοχημική εξέταση, ένα αρνητικό αποτέλεσμα σημαίνει ότι το αντιγόνο δεν ανιχνεύτηκε, όχι ότι το αντιγόνο δεν υπήρχε στα κύτταρα/στον ιστό που εξετάστηκε. Εάν είναι απαραίτητο, χρησιμοποιήστε μια σειρά αντισωμάτων για την αναγνώριση ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων.

Περιορισμοί

Η ανοσοϊστοχημεία είναι μια διαγνωστική διεργασία πολλαπλών βημάτων, η οποία αποτελείται από ειδικευμένη εκπαίδευση στην επιλογή των κατάλληλων αντιδραστηρίων, επιλογή ιστού, μονιμοποίηση και επεξεργασία, παρασκευή της πλάκας IHC και ερμηνεία των αποτελεσμάτων της χρώσης.

Η χρώση του ιστού εξαρτάται από το χειρισμό και την επεξεργασία του ιστού πριν από τη χρώση. Τυχόν εσφαλμένη μονιμοποίηση, καψύξη, απόψυξη, πλύση, στέγνωμα, θέρμανση, τομή ή μόλυνση με άλλους ιστούς ή υγρά ενδέχεται να παράγει μορφώματα, παγίδευση αντισώματος ή ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Τυχόν ασυνεπή αποτελέσματα ενδέχεται να οφείλονται σε παραλλαγές των μεθόδων μονιμοποίησης και εγκλεισμού ή σε εγγενείς ανωμαλίες εντός του ιστού.⁷

Τυχόν υπερβολική ή ατελής αντιχρώση ενδέχεται να διακυβεύσει τη σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε χρώσης ή της απουσίας της θα πρέπει να συμπληρώνεται με μορφολογικές μελέτες που χρησιμοποιούν σωστούς μάρτυρες και θα πρέπει να αξιολογείται στα πλαίσια του κλινικού ιστορικού του ασθενούς και άλλων διαγνωστικών εξετάσεων από ειδικευμένο παθολογοανατόμο.

Το Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K προορίζεται για χρήση σε τομές εγκλεισμένες σε παραφίνη με ειδικές απαιτήσεις μονιμοποίησης. Δεν απαιτούν όλα τα αντιγόνα ανάκτηση επιτόπου. Οι βέλτιστες συνθήκες για την ανάκτηση επιτόπου πρέπει να επικυρώνονται από το χρήστη, καθώς αυτές εξαρτώνται από τον ιστό, τη μονιμοποίηση ή/και το πρωτοταγές αντίσωμα. Ενδέχεται να παρουσιαστεί μη αναμενόμενη έκφραση αντιγόνου, ειδικά σε νεοπλάσματα. Η κλινική ερμηνεία οποιασδήποτε κεχωρισμένης τομής ιστού πρέπει να περιλαμβάνει μορφολογική ανάλυση και την αξιολόγηση των κατάλληλων μαρτύρων.

Χαρακτηριστικά απόδοσης

Η απόδοση του Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K έχει επικυρωθεί με χρήση πρωτοταγών αντισωμάτων Novocastra™ για τα οποία η θρυψίνη είναι η συνιστώμενη τεχνική ανάκτησης. Το προϊόν αυτό είναι σταθερό έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος.

Βιβλιογραφία

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. Laboratory Investigations. 1976 Oct;35(4):383-390.
2. Bancroft JD and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadjji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. Current Diagnostic Pathology. 2001; 7:161-167.
7. Omata M, Liaw CT, Ashcavi M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.

Τροποποιήσεις στην προηγούμενη έκδοση

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις.

Ημερομηνία έκδοσης

17 Φεβρουαρίου 2015

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC)

Produktnummer: RE7160-K

Tilsigtet anvendelse

Til in vitro-diagnostisk anvendelse.

Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) er beregnet til enzymatisk forbehandling af formalin-fikserede, paraffin-indlejrede vævssnit for inkubation med et primært antistof i en immunhistokemisk (IHC) procedure. Dette produkt kan anvendes til epitopgenfindning med Novocastra™-antistoffer, hvortil trypsin anbefales. Kendte undtagelser til dette er: NCL-BrdU, NCL-CYCLIN D1, NCL-COLL-1p og NCL-CYCLIN D1-GM. Den kliniske tolkning af en eventuel farvning eller fravær heraf skal suppleres med morfologiske undersøgelser ved anvendelse af passende kontroller og skal evalueres af en kvalificeret patolog på baggrund af patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests.

Procedureprincip

Enzymforbehandling af formalin-fikserede, paraffin-indlejrede vævssnit forbedrer farvningen af nogle antistoffer ved at eksponere epitoper i væv, der er blevet skjult under fiksering. Det første proteolytiske enzym, der blev anvendt til epitopgenfindning, var trypsin.¹ Andre proteolytiske enzymer, der kan anvendes til dette formål, indbefatter Protease XXIV og pepsin.² For nyligt er også blevet anvendt proteinase K, der er almindeligt anvendt i in situ-hybridiseringsteknikker.

Dette produkt anvendes i en IHC-procedure, der åbner mulighed for kvalitativ identifikation ved lysmikroskopi af antigener i snit af formalin-fikseret, paraffin-indlejret væv ved anvendelse af sekventielle trin med mellemliggende vasketrin (for oplysninger om procedureprincipet for IHC-farvning henvises til brugsanvisningen til det anvendte detektionssystem). Epitopgenfindning ved hjælp af enzymatisk forbehandling anbefales til et begrænset antal af antistoffer (se primært antistof **Anbefalinger for anvendelse**). Optimal betingelser for epitopgenfindning skal valideres af brugeren, da disse afhænger af væv, fiksering og/eller primært antistof.

Medfølgende reagenser

1. Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126 (0,75 ml). Enzym i 40 % volumen/volumen glycerol, der indeholder 10 mM TrisHCl, pH7,5, med 1 mM calciumacetat.
2. Enzyme Proteinase K Buffer RE7127 (100 ml). Trisbufferet saltvand, overfladeaktivt stof og 0,35 % ProClin™ 950.
3. Tom dråbetællerflaske

Rekonstituering, blanding, fortynding, titrering

Novocastra™ Enzyme Proteinase K Concentrate RE7126-K kræver fortynding i Proteinase K Buffer RE7127 til fremstilling af en arbejdsopløsning (se Proteinase K-arbejdsopløsning). Brugeren skal validere en eventuel sådan ændring. Yderligere fortynding kan resultere i tab af antigenfarvning. Brugeren skal validere en eventuel sådan ændring.

Opbevaring og stabilitet

Opbevares ved 2–8 °C. Må ikke fryses. Returneres til 2–8 °C straks efter brug. Må ikke anvendes efter udløbsdatoen, der er angivet på produktetiketten. Opbevaringsbetingelser, der er forskellige fra de anførte, skal verificeres af brugeren. Der er ingen tydelige tegn, der viser ustabilitet for dette produkt, der skal derfor køres positive og negative kontroller samtidigt med patientprøver.

Klargøring af prøver

Det anbefalede fikseringsmiddel er 10 % neutralbufferet formalin til paraffin-indlejrede vævssnit.

Advarsler og forholdsregler

ENZYME PROTEINASE K CONCENTRATE

Indeholder og Proteinase K
(<10%).

GHS08: Sundhedsfarer.

Signalord: Fare.

H334: Kan forårsage
allergi-eller astmasymptomer eller
åndedrætsbesvær ved indånding.

P261: Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray.

P285: Ved utilstrækkelig udluftning anvendes
åndedrætsværn.

P304+341: VED INDÅNDING: Ved vejtrækningsbesvær:
Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at
vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen.

P342+311: Ved luftvejssymptomer: Ring til en
GIFTINFORMATION eller en læge.

P501: Indholdet/Beholderen bortskaffes i et
indsamlingssted for farligt affald og problemaffald.

Et Materialesikkerhedsdataark kan rekvireres eller findes på www.LeicaBiosystems.com

Til anvendelse af uddannet fagpersonale.

Prøver før og efter fiksering samt alle materialer, der eksponeres for disse, skal håndteres som potentielt smittefarlige og bortskaffes under passende forholdsregler.³

Pipetter aldrig reagenser med munden og undgå, at reagenser og prøver kommer i kontakt med hud og slimhinder. Hvis reagenser eller prøver kommer i kontakt med følsomme områder, skal der skylles med rigelige mængder vand.

Konsulter offentlige eller lokale regler for bortskaffelse af potentielt toksiske bestanddele.

Minimér mikrobiel kontaminering af reagenser, da dette kan medføre øget uspecifik farvning. Inkuberingsstider eller temperaturer, der er anderledes end de anførte, kan medføre fejlagtige resultater. En eventuel sådan ændring skal valideres af brugeren.

Procedure

A. Nødvendige reagenser, der ikke medfølger

Se brugsanvisningen til det primære antistof

B. Nødvendigt udstyr, der ikke medfølger

Almindeligt immunhistokemisk laboratorieudstyr.

C. Metodik

Før brugere gør brug af denne metodik, skal de være uddannet i immunhistokemiske teknikker, og brugen af kombinationen af Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K, primært antistof, dets fortynding, sammen med detektionssystemet skal valideres af brugeren på en serie af kendte positive og negative kontroller.

Med mindre andet er anført, skal alle trin udføres ved stuetemperatur (25 °C). Følgende trin skal udføres før inkubation med det primære antistof.

1. Vask objektglas i deioniseret vand.
2. Inkubér med Proteinase K-arbejdsløsning (se Proteinase K-arbejdsløsning) i 5 minutter.
3. Vask i TBS.
4. Fortsæt med IHC-protokol i henhold til producentens brugsanvisning til det primære antistof og detektionssystemet.

Proteinase K-arbejdsløsning

Tilsæt 40 µl Proteinase K Concentrate RE7126 til 6 ml Proteinase K Buffer RE7127. Fyld opløsningen i den medfølgende dråbetællerflaske. Arbejdsløsningen er stabil i op til 3 måneder ved opbevaring ved 2–8 °C.

Kvalitetskontrol

Forskelle i vævsbehandling og tekniske procedurer i brugerens laboratorium kan medføre en signifikant variation i resultaterne, der nødvendiggør regelmæssig udførelse af interne kontroller foruden følgende procedurer. Kontrollerne skal være autopsi/biopsi/ kirurgiske prøver, der formalin-fikseres, behandles og paraffinvoiks-indstøbes så hurtigt som muligt på samme måde som patientprøven/ patientprøverne.

Positiv vævskontrol

Anvendes til visning af korrekt præpareret væv og korrekte farvnings teknikker. Der skal inkluderes én positiv vævskontrol for hvert sæt af testbetingelser/primært antistof i hver farvningskørsel. Et væv med svag positiv farvning er mere egnet end et væv med kraftig positiv farvning til optimal kvalitetskontrol og til detektion af mindre grader af reagensdegradering.⁴ For oplysninger om anbefalet positivt kontrolvæv henvises til brugsanvisningen til det primære antistof. Hvis den positive vævskontrol ikke viser positiv farvning, bør resultaterne fra patientprøverne betragtes som ugyldige.

Negativ vævskontrol

Skal undersøges efter den positive vævskontrol for at verificere specificiteten af mærkningen af målantigenet ved hjælp af det primære antistof. For oplysninger om anbefalet negativt kontrolvæv henvises til brugsanvisningen til det primære antistof. Alternativt giver variationen af forskellige celletyper, der er til stede i de fleste vævssnit, ofte negative kontrolsteder, men dette bør verificeres af brugeren. Hvis der forekommer uspecifik farvning, har den ofte en diffus fremtoning. Sporadisk farvning af bindevæv kan også forekomme i snit fra kraftigt formalinfikserede væv. Brug intakte celler til tolkning af farvningsresultater. Nekrotiske eller degenererede celler farves ofte uspecifikt.⁵

Falsk positive resultater kan forekomme på grund af ikke-immunologisk binding af proteiner eller substratreaktionsprodukter. De kan også skyldes endogene enzymer, såsom pseudoperoxidase (erythrocytter), endogen peroxidase (cytochrom C) eller endogen biotin⁶ (f.eks. lever, bryst, hjerne, nyre). For at adskille endogen enzymaktivitet eller uspecifik binding af enzymer fra specifik immunreaktivitet kan yderligere patientvæv farves udelukkende med henholdsvis substratkromogen, streptavidin-HRP eller mærket polymer og substratkromogen. Hvis der forekommer specifik farvning i den negative vævskontrol, bør resultaterne af patientprøverne betragtes som ugyldige.

Negativ reagenskontrol

Brug en uspecifik negativ reagenskontrol i stedet for det primære antistof sammen med et snit af hver patientprøve for at vurdere uspecifik farvning og åbne mulighed for en bedre tolkning af specifik farvning i antigenstedet.

Patientvæv

Undersøg farvede patientprøver til sidst. Intensiteten af positiv farvning skal vurderes på baggrund af eventuel uspecifik baggrundsfarvning af den negative reagenskontrol. Som ved alle immunhistokemiske tests betyder et negativt resultat, at antigenet ikke blev påvist, ikke at antigenet var fraværende i de analyserede celler eller det analyserede væv. Brug om nødvendigt et panel af antistoffer til at identificere falske negative reaktioner.

Begrænsninger

Immunhistokemi er en flertrins-diagnostisk proces, der består af specialiseret træning i valget af passende reagenser; vævsvalg, fiksering og forarbejdning; præparering af IHC-objektglasset; og tolkning af farvningsresultaterne.

Vævsfarvning afhænger af håndteringen og behandlingen af vævet før farvningen. Ukorrekt fiksering, frysnng, optøning, vask, tørring, opvarmning, skæring eller kontaminering med andre væv eller væsker kan frembringe artefakter, antistofindfangning eller falske negative resultater. Inkonsekvente resultater kan skyldes variationer i fikserings- og indstøbningsmetoder eller iboende uregelmæssigheder i selve vævet.⁷

Kraftig eller ufuldstændig kontrastfarvning kan påvirke en korrekt tolkning af resultaterne.

Den kliniske tolkning af en eventuel farvning eller fravær heraf skal suppleres med morfologiske undersøgelser ved anvendelse af passende kontroller og skal evalueres af en kvalificeret patolog på baggrund af patientens kliniske historie og andre diagnostiske tests. Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K er til anvendelse på paraffin-indlejrede snit med specifikke fikseringskrav. Ikke alle antigener kræver epitopgenfindning. Optimale betingelser for epitopgenfindning skal valideres af brugeren, da disse afhænger af væv, fiksering og/eller primært antistof. Uventet antigenekspression kan forekomme, især i neoplasmer. Den kliniske tolkning af et farvet vævssnit skal inkludere en morfologisk analyse og en evaluering af passende kontroller.

Ydeevne-egenskaber

Ydeevnen for Novocastra™ Enzyme Proteinase K (IHC) RE7160-K er blevet valideret ved brug af Novocastra™ primære antistoffer, for hvilke trypsin er den anbefalede genfindningsteknik. Dette produkt er stabilt til udløbsdatoen, der er angivet på produktetiketten.

Litteraturliste

1. Huang SN, Minassian H and More JD. Application of immunofluorescent staining on paraffin sections improved by trypsin digestion. *Laboratory Investigations*. 1976 Oct;35(4):383–390.
2. Bancroft JD and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4th Edition. Churchill Livingstone, New York. 1996.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991;7(9). Order code M29-P.
4. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. *Progress in Surgical Pathology*. 6:1–15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
5. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. *Laboratory Medicine*. 1983; 14:767.
6. Mount SL, Cooper K. Beware of biotin: a source of false-positive immunohistochemistry. *Current Diagnostic Pathology*. 2001; 7: 161–167.
7. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. *American Journal of Clinical Pathology*. 1980; 73:626.

Ændringer til tidligere udgave

Advarsler og forholdsregler.

Udfærdigelsesdato

17 februar 2015

Leica Biosystems Newcastle Ltd
Balliol Business Park West
Benton Lane
Newcastle Upon Tyne NE12 8EW
United Kingdom
J +44 191 215 4242

